



**PCT**  
**WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM**  
**Internationales Büro**  
**INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE**  
**INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)**

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>5</sup> :  <b>A61K 47/48, C12N 15/78</b>		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 94/23751</b>	
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>27. Oktober 1994 (27.10.94)</b>	
			(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, FI, HU, JP, KR, NO, NZ, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
			<b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.  Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP94/01147 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 13. April 1994 (13.04.94)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> P 43 12 131.4 14. April 1993 (14.04.93) DE P 43 18 470.7 3. Juni 1993 (03.06.93) DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; D-68298 Mannheim (DE).			<b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> SUROVOY, Andrej [RU/DE]; Steig 6, D-72108 Rottenburg am Neckar (DE). DANNULL, Jens [DE/DE]; Postdamer Chaussee 47D, D-14129 Berlin (DE). MOELLING, Karin [DE/CH]; Hadlaubstrasse 4, CH-8044 Zürich (CH). JUNG, Günther-Gerhard [DE/DE]; Ob der Grafenhalde 5, D-72076 Tübingen (DE).	
<b>(74) Anwälte:</b> SCHREINER, Siegfried usw.; Boehringer Mannheim GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68298 Mannheim (DE).				

**(54) Title:** NUCLEIC ACID TRANSFER PEPTIDES AND THEIR USE FOR INJECTING NUCLEIC ACIDS INTO EUKARYOTIC CELLS

**(54) Bezeichnung:** NUKLEINSÄURE-TRANSFERPEPTIDE UND DEREN VERWENDUNG ZUR EINSCHLEUSUNG VON NUKLEINSÄUREN IN EUKARYONTISCHE ZELLEN

**(57) Abstract**

A nucleic acid transfer peptide contains: (a) a first ligand selected in the group of peptides, steroids, carbohydrates, lipids or vitamins which binds to a binding partner at the surface of eucaryotic cells, triggering an endocytosis of the complex composed of said nucleic acid transfer peptide and a nucleic acid; (b) a second ligand selected in the group of peptides, steroids, carbohydrates, lipids or vitamins which binds to a binding partner on the outer membrane of the nucleus of eucaryotic cells; (c) a third ligand which is a basic peptide and binds to nucleic acids by ion exchange. These peptides are useful for injecting nucleic acids into eucaryotic cells.

**(57) Zusammenfassung**

Nukleinsäure-transferpeptid enthaltend: a) einen ersten Liganden, ausgewählt aus der Gruppe Peptid, Steroid, Kohlenhydrat, Lipid oder Vitamin, welcher an einen Bindepartner an der Zelloberfläche von eukaryontischen Zellen bindet und dabei eine Endozytose des Komplexes aus dem genannten Nukleinsäure-transferpeptid und einer Nukleinsäure auslöst, b) einen zweiten Liganden, ausgewählt aus der Gruppe Peptid, Steroid, Kohlenhydrat, Lipid oder Vitamin, welcher an einem Bindepartner auf der äußeren Kernmembran von eukaryontischen Zellen bindet, c) einen dritten Liganden, welcher ein basisches Peptid ist und durch ionische Wechselwirkung an Nukleinsäuren bindet, sind zur Einschleusung von Nukleinsäuren in eukaryontische Zellen geeignet.

#### **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Oesterreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

**Nukleinsäure-transferpeptide und deren Verwendung zur  
Einschleusung von Nukleinsäuren in eukaryontische Zellen**

Die Erfindung betrifft Nukleinsäure-transferpeptide und ein Verfahren zur Einschleusung von Nukleinsäuren in eukaryontische Zellen sowie Komplexe, in denen Nukleinsäuren durch ionische Wechselwirkung an die erfindungsgemäßen Nukleinsäure-transferpeptide gebunden sind und deren Verwendung zur Herstellung von Therapeutica.

zur Einführung von Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen und insbesondere in Säugerzellen ist eine Vielzahl von Verfahren, beispielsweise die Calciumphosphat-Transfektion, Polybren-Transfektion, Protoplasten-Fusion, Elektroporation, Lipofektion und Mikroinjektion bekannt. Die Anwendung dieser Verfahren ist jedoch auf die *in vitro*-Transfektion beschränkt. Zudem haben diese Methoden oftmals eine geringe Effizienz und es fehlt die Zellspezifität.

Die Effizienz der Einschleusung von Nukleinsäuren in Zellen kann verbessert werden durch Bindung der Nukleinsäure an Polykationen, wie Polylysin (Lemaitre Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 648) oder an amphiphilen Molekülen, wie Polyethylenglykol (WO 88/0981). Auch mit derartigen Komplexen kann jedoch ebenfalls keine Zellspezifität erreicht werden.

In der WO 91/17173 sind Konjugate beschrieben, die kovalent gekoppelt eine Bindedomäne und eine Effektordomäne enthalten. Beide Domänen können über einen Linker verbunden sein. Dabei ist die Bindedomäne beispielsweise ein Zelloberflächenrezeptor und die Effektordomäne eine antisense composition. Dabei kann der Linker spezifisch für eine subzellulare Region, wie beispielsweise für den Kern, sein. Ein derartiges Konjugat ist jedoch für eine genetherapeutische Anwendung nicht geeignet, da durch die kovalente Kopplung der antisense composition keine brauchbare Beeinflussung der Expression von zelleigenen Genen erreicht werden kann.

Um Zellspezifität zu erreichen, können Nukleinsäuren nicht-kovalent an Konjugate aus Proteinen und Polykationen gekoppelt werden (Wu und Wu, J. Biol. Chem. (1987), 4429 - 4432, J. Biol. Chem. 263 (1988), 14621 - 14624). Danach erfolgt die Einschleusung von fremder DNA in Zellen mit Hilfe eines löslichen DNA-Trägersystems, das aus einem chemisch synthetisierten Konjugat mit Mannose und Lactose als Liganden (P. Midoux et al., Nucleic Acid Res. 21 (1993) 871 - 878) besteht. In der EP-A 0 388 758 werden chemisch synthetisierte Transferrin Polykation-Konjugate offenbart, die mit polyanionischen Nukleinsäuren Komplexe bilden. Durch Bindung an den Transferrinrezeptor können diese Komplexe in Zielzellen eingeschleust werden.

Die Verwendung von Konjugaten aus Polylysin und Asialo-glycoprotein (Wu et al., J. Biol. Chem. 263 (1988), 14621 - 14624) oder mit einem Galactoseliganden (Plank et al., Bioconjugate Chem., 3, (1992), 533 - 539) ist ebenfalls bekannt. Als Liganden wurden auch inaktivierte Adenoviren (Cotten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, (1992), 6094 - 6098, Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 (1992) 6099 - 6103) oder Hämagglutinininfusionspeptide

(Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, (1992), 7934 - 7938) verwendet. Wesentliche Nachteile dieser Konjugate sind jedoch, daß sie schwierig in reproduzierbarer Form herzustellen sind, ausgeprägte Immunreaktionen hervorrufen und keine befriedigende Effizienz, insbesondere zum Transfer von größeren Nukleinsäuren, wie Vektoren, zeigen. In der WO 93/07283 wird ebenfalls zum nichtviralen Gentransfer ein "2-Liganden-System" aus DNA-bindendem (polykationischen)-Anteil (Nukleinsäure-affine Substanz) und einem Internalisierungsfaktor zur Aufnahme der DNA in die Zelle beschrieben. Als Beispiel wird ein Polylysin-Transferrin-Komplex genannt. Diese DNA-haltigen Komplexe werden über Endozytose in die Zellen aufgenommen. Die Effektivität des Verfahrens ist jedoch nicht befriedigend. Außerdem besteht die Möglichkeit, daß die Komplexe bei der Internalisierung in Lysosomen gelangen und abgebaut werden, bevor die DNA den Zellkern erreicht.

Zur Freisetzung der Komplexe aus den Endosomen ins Cytoplasma wird in der WO 93/07283 diesen Komplexen ein sogenanntes endosomolytisches Mittel zugesetzt, welches beispielsweise einem Virus oder einer Viruskomponente entspricht (z. B. Adenovirus oder Influenza-Hämaggglutinin).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es somit, Nukleinsäure-transferpeptide zur Verfügung zu stellen, welche einfach herzustellen sind, Nukleinsäuren mit hoher Effizienz in Zellen transportieren können, die Effizienz der stabilen Gentransformation verbessern, geringe Immunreaktionen hervorrufen und in der Zielzelle gut abbaubar sind.

Die erfindungsgemäße Aufgabe wird gelöst durch ein

Nukleinsäure-transf rpeptid, welches enthält:

- a) einen ersten Liganden, ausgewählt aus der Gruppe Peptid, Steroid, Kohlenhydrat, Lipid oder Vitamin, welcher an einen Bindepartner auf der Zelloberfläche von eukaryontischen Zellen bindet und dabei eine Endozytose des Komplexes aus dem genannten Nukleinsäure-transferpeptid und einer Nukleinsäur auslöst,
- b) einen zweiten Liganden, ausgewählt aus der Gruppe Peptid, Steroid, Kohlenhydrat, Lipid oder Vitamin, welcher an einen Bindepartner auf der äußeren Kernmembran von eukaryontischen Zellen bindet,
- c) einen dritten Liganden, welcher ein basisches Peptid ist und durch ionische Wechselwirkung an Nukleinsäuren bindet.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Komplex, der ein erfindungsgemäßes Peptid und eine durch ionische Wechselwirkung gebundene Nukleinsäure enthält. Die Nukleinsäure, die einen Komplex mit dem Protein bildet, kann eine lineare, zirkuläre, einzel- oder doppelsträngige DNA oder RNA, triple-helix DNA, ein DNA-RNA-Hybrid oder PNA sein. Ferner kann die Nukleinsäure auch chemisch modifiziert sein, sofern die negative Ladung der Phosphatgruppen soweit erhalten bleibt, daß die ionische Bindung zum erfindungsgemäßen Fusionspolybindepeptid erhalten bleibt. Derartige Nukleinsäurederivate sind beispielsweise Thioate und Dithioate. Weitere Derivate sind beschrieben in Uhlmann und Peyman, Chemical Reviews 90 (1990) 544 - 584, wobei der Inhalt dieser Veröffentlichung Gegenstand der Offenbarung ist.

Nukleinsäuren mit chemisch modifizierten Nukleotidbasen, z. B. RNA-Moleküle, bei denen die 2'-OH-Gruppe in einem oder mehreren Nukleotiden durch eine O-Alkylgruppe, O-Allylgruppe, Halogengruppe oder andere Modifizierungsgruppen ersetzt ist, sind ebenfalls geeignet.

Vorzugsweise ist die in die eukaryontische Zielzellen einzuschleusende Nukleinsäure eine DNA oder eine ggf. modifizierte RNA. Die in die Zielzelle eingeschleuste Nukleinsäure kann beispielsweise genetische Informationen enthalten, die in der Zielzelle zur Beseitigung von genetisch bedingten Defekten exprimiert werden können. Ebenso kann die in die Zielzelle einzuschleusende Nukleinsäure auch Antisenseeigenschaften (Komplementarität zu einer in der Zielzelle vorliegenden mRNA) zur Hemmung der Expression von spezifischen Genen in der Zielzelle besitzen. Ebenso kann die einzuschleusende Nukleinsäure ein Ribozym sein, welches in spezifischer Weise RNA der Zielzellen spaltet. Derartige Ribozyme sind beispielsweise in Rossy und Sarver, TIBtech 8 (1990) 179 -183 beschrieben, wobei der Inhalt dieser Veröffentlichung Gegenstand der Offenbarung ist. Die Einführung von Antisense- oder Ribozymnukleinsäuren in spezifische Zielzellen kann, insbesondere bei der Therapie viraler Erkrankungen, wie z. B. AIDS, eine wichtige Rolle spielen. Die Einführung der Nukleinsäure kann dabei mit dem Ziel erfolgen, eine dauerhafte oder transiente Expression des eingeführten Gens bzw. mehrerer Gene oder einer Antisense-Sequenz zu erreichen. Zur weiteren Verbesserung der Einschleusung der Nukleinsäure in eukaryontische Zellen können Hilfsmittel zur Zellfusion zugesetzt werden.

**Bevorzugt werden die Nukleinsäure-Transferpeptide zur**

Einschleusung von Nukleinsäuren verwendet, mit denen eine Regulation der endogenen Genexpression in der eukaryontischen Zielzelle sowohl *in vivo* als auch *in vitro* erfolgen kann. Diese Regulation erfolgt durch Insertion von geeigneten Nukleinsäureelementen in das Genom durch homologe Rekombination. Eine hierfür geeignete Nukleinsäure enthält ein DNA-Regulationssegment, welches in der Lage ist, die Expression des zu regulierenden Gens zu modulieren, wenn es operativ an dieses Gen gekoppelt ist, sowie ein DNA-Targeting-Segment, welches homolog zu einer Region innerhalb oder in der Nähe des zu modulierenden Gens ist. Bei der homologen Rekombination wird dieses Konstrukt in das Genom so insertiert, daß das Regulationssegment operativ mit dem zu modulierenden Gen verbunden ist. Verfahren zur homologen Rekombination sind beispielsweise in der WO 91/09955 und bei Thomas und Capecchi, Cell 51 (1987), 503 - 513 beschrieben, wobei der Gegenstand dieser Publikationen Gegenstand der Offenbarung ist. Es hat sich gezeigt, daß bei Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure-Transferpeptide die homologe Rekombination effektiv erfolgt.

Als Gene sind vorzugsweise Markergene (z.B. Resistenzgene für Neomycin, HPRT, tk), Selektionsgene (z.B. für Methotrexat) oder funktionell aktive, in eukaryontischen Zellen exprimierbare Gene geeignet.

Vorzugsweise ist die einzuschleusende Nukleinsäure ein Vektor, der eine exogene Nukleinsäure trägt (z.B. Plasmid oder Cosmide). Üblicherweise sind die drei Liganden des Nukleinsäure-transferpeptides kovalent aneinander gebunden. In einer bevorzugten Ausführungsform des Komplexes sind die Liganden über die zu transferierende Nukleinsäure miteinander verbunden. Dabei ist die Nukleinsäure also

ein bi- oder multifunktioneller Bindepartn r für die Liganden. Dies bedeutet, daß beispielsweise eine Verbindung, welche aus erstem und drittem Ligand besteht, und eine weitere Verbindung, die aus zweitem und drittem Ligand besteht, über ionische Wechselwirkungen zwischen drittem Ligand und Nukleinsäure komplex gebunden sind. Weitere Varianten wie Komplexe aus Nukleinsäure mit einer Verbindung aus den Liganden 1/2/3 und einer Verbindung aus den Liganden 3/4 sind ebenfalls geeignet. Dabei sind demnach mindestens zwei Liganden über die Nukleinsäure gebunden.

Besonders bevorzugt sind die erfindungsgemäßen Nukleinsäuretransferpeptide zur Einschleusung von RNA, Ribozymen und kurzkettigen Oligonukleotiden (z. B. Antisense-Sequenzen) bis ca. 30 Nukleotiden Länge geeignet. In diesen Fällen sind auch Nukleinsäuretransferpeptide ohne den zweiten, kernbindenden Liganden zur Komplexierung von DNA und zur erfindungsgemäßen Verwendung geeignet. Derartige Komplexe besitzen eine überraschend hohe Serumstabilität und Stabilität in Säugerzellen. Mit diesen Komplexen ist vorzugsweise ein Verfahren zur Bestimmung der Proliferationshemmung durch RNA, Ribozyme und kurzkettige Oligonukleotide (z. B. Antisense-Sequenzen) möglich. Bei diesem Verfahren werden die Zellen, vorzugsweise Tumorzellen, mit den Komplexen inhibiert und nach Weiterkultivierung der Zellen (mehrere Stunden oder Tage) die Anzahl der gebildeten Zellen oder DNA-Menge nach dem Fachmann geläufigen Verfahren bestimmt. Die Bestimmung der DNA-Menge erfolgt beispielsweise über Anfärbung mit Ethidiumbromid oder MTT (Beispiel 6)

Die im erfindungsgemäßen Nukleinsäure-transferpeptid verwend ten und an Bindepartner auf Zelloberflächen bzw. an die äußere Kernmembran bind nde Liganden sind Peptide,

Steroide, Kohlenhydrate, Lipide oder Vitamine. Die Aufgabe der Liganden besteht darin; den Komplex aus Nukleinsäure und Peptid an Zelloberflächenrezeptoren, Zelloberflächenmoleküle, Zelladhäsionsmoleküle, Zellmembranen bzw. die äußere Kernmembran zu binden.

Besonders bevorzugt werden als erste Liganden Peptide mit kurzen Sequenzen verwendet, beispielsweise das Peptid RGD, welches eine Bindungsstelle für den Integrinrezeptor an Zelloberflächen darstellt oder die gp120-Bindungsstelle.

Weitere geeignete erste Liganden sind beispielsweise die Bindedomänen von Wachstumsfaktoren, Hormonen, viralen Antigenen, Toxinen, Lipoproteinen und deren kurzkettige Fragmente, welche ebenfalls an Bindepartner an Zelloberflächen binden. Bevorzugt als Wachstumsfaktoren werden CSF (Colony stimulierende Faktoren), NGF (nerve growth factor), PDGF (platelet derived growth factor), EGF (epidermal growth factor) verwendet. EGF-analoge Bindedomänen finden sich in einer Vielzahl von Proteinen (R.F. Doolittle, CSH Symp. 51 (1986), 447), wobei der Inhalt dieser Veröffentlichung Gegenstand der Offenbarung ist.

Ebenfalls bevorzugt als Peptide sind Lectine und deren kurzkettige Fragmente, die an Kohlenhydratstrukturen an Zelloberflächen und Kernmembranen binden (Übersicht vgl. J. C. Paulson, The Receptors, Vol. 2 (1985), P. M. Conn, Ed., Academic Press N. Y.).

Als Steroide sind bevorzugt Progesteron, Androgen, Östrogen.

Als Kohlenhydrate sind bevorzugt Galactose, Mannose-6-phosphat, Mannose, Lewis-X-Kohlenhydrate, Glucose, Fucose.

Als Lipide sind bevorzugt Fettsäuren und Arachidonsäure.  
Als Vitamine sind bevorzugt Vitamin A oder D<sub>3</sub>.

Als zweiter Ligand sind Peptide, Steroide, Kohlenhydrate, Lipide oder Vitamine geeignet, welche eine Bindung des Nukleinsäure-transferpeptides an die äußere Kernmembran von eukaryontischen Zellen vermitteln.

Geeignete Peptide sind beispielsweise von De Robertis, Nature 272, 1978, 254 - 256 und Dingwall, Cell 30 (1982), 449 - 458 beschrieben, wobei der Inhalt dieser Publikationen Gegenstand der Offenbarung ist. Als Sequenzmotiv bekannt ist beispielsweise PKKKRKV (SEQ ID No. 1), (Lanford und Butel, Cell 37 (1984), 801 - 813). Die Effektivität eines Nukleinsäurebindepeptids, welches dieses Motiv als zweiten Liganden enthält, kann noch gesteigert werden durch Ergänzung um 15 Aminosäuren, welche unmittelbar an dieses Motiv im SV40 T-Antigen anschließen (Rihs und Peters, EMBO J. 1989, 1479 - 1484), wobei der Inhalt dieser Veröffentlichung Gegenstand der Offenbarung ist. Es ist ebenfalls bevorzugt, Modifikationen, wie beispielsweise eine Phosphorylierung, in diesen Motiven anzubringen, wodurch die Effektivität gesteigert werden kann (McVey, Nature 341 (1989) 503 - 507 und Rihs et al., EMBO J. 10 (1991) 633 - 639), wobei der Inhalt dieser Publikationen Gegenstand der Offenbarung ist.

Ein weiteres Peptidmotiv, welches als zweiter Ligand geeignet ist, ist die Sequenz KRPAATKKAGQAKKKKL (SEQ ID NO.2) sowie Modifikationen davon, vgl. Tabelle 2 (Robbins, Cell 64 (1991), 615 - 623). Weiter geeignete Proteine sind das H3/H4-Bind protein N1 von Xenopus (Kleinschmidt und Seiter, EMBO J. 7 (1988), 1605 - 1614, wobei der Inhalt

dies r Veröffentlichung Gegenstand der Offenbarung ist.) und Polymerase 1 des Influenzavirus (Nath und Nayak, Mol. Cell Biol. 10 (1990), 4139 - 4145, wobei der Inhalt dieser Veröffentlichung Gegenstand der Offenbarung ist.). Weiter als zweiter Ligand geeignete Peptidmotive sind in Tabelle 1 genannt. Ein wesentliches Merkmal von Peptidmotiven, welche als zweiter Ligand geeignet sind, ist, daß diese Peptide eine Vielzahl von basischen Aminosäuren enthalten sollten.

Eine weitere von dem SV40 T-Antigen abgeleitete Sequenz ist VSKRPRP (SEQ ID NO. 3) (Richardson, Cell 44 (1986), 77 - 85). Weitere geeignete Motive finden sich im Influenzavirus non structural protein (Greenspan, J. Virol. 62 (1988), 3020 - 3026, wobei der Inhalt dieser Veröffentlichung Gegenstand der Offenbarung ist.), Adenovirus DNA-Bindeprotein (Morin, Mol. Cell Biol. 9 (1989), 4372 - 4380, wobei der Inhalt dieser Veröffentlichung Gegenstand der Offenbarung ist.), Hefe MATA2, Glucokortikoidrezeptor (Garcia-Bustos, Biochim. Biophys. Acta, 1071 (1991) 83 - 101, wobei der Inhalt dieser Veröffentlichung Gegenstand der Offenbarung ist.)

---

Vorzugsweise ist das Peptidmotiv im Nukleinsäure-transferpeptid mehrfach enthalten.

Der Glucokortikoidrezeptor ist ein Protein mit einem Zinkfinger, welches an DNA binden kann und vorzugsweise in Gegenwart von Glucokortikoid die Bindung an die äußere Kernmembran vermittelt. Bei Verwendung von Motiven aus dem Glucokortikoidrezeptor ist es also bevorzugt, Glucokortikide, welche auch kovalent an das erfindungsgemäße Peptid gekoppelt sein können, zuzusetzen. Der Glucokortikoidrezeptor enthält zwei geeignete Motive (nuclear localizing

sequence (NLS1, NLS2), Picard und Yamamoto, EMBO J. 6 (1987), 3333 - 3340, wobei der Inhalt dieser Veröffentlichung Gegenstand der Offenbarung ist). NLS1 besteht aus 28 Aminosäuren.

Aus dem humanen Östrogenrezeptor (Picard, Cell Regul. 1 (1990), 291 - 299, wobei der Inhalt dieser Veröffentlichung Gegenstand der Offenbarung ist.) ist die Domäne der Aminosäuren 256 - 303 als zweiter Ligand bevorzugt.

Weiter bevorzugt ist, als zweiten Liganden die targeting-Signale von Nucleoplasmin E1A und SV40 large T-Antigen zu verwenden (Yamasaki, Mol. Cell Biol. 9 (1989) 3028 - 3036, wobei der Inhalt dieser Veröffentlichung Gegenstand der Offenbarung ist). Nucleoplasmin enthält ein Motiv, welches aus zwei basischen Aminosäureresten besteht, gefolgt von einem Spacer von zehn anderen Resten und einem Cluster von 5 Aminosäuren von denen 4 basisch sind.

Unter dem dritten Ligand ist eine Polyaminosäure (im weiteren auch mit Motiv bezeichnet) zu verstehen, welche spezifisch oder unspezifisch Nukleinsäuren in kleinen definierten Domänen und unabhängig vom sonstigen Aufbau der Nukleinsäure erkennt. Einige dieser Erkennungsmotive sind in Transkriptionsfaktoren und chromosomal Proteinen enthalten.

Beispielsweise zu finden sind derartige Motive, welche Serin, Prolin und basische Aminosäuren enthalten, mehrfach am Amino- und Carboxyende des Histons H1 und am Aminoterminus des Histons H2B aus Seeigelsperma. Ein derartiges Motiv ist beispielsweise STPKRKR (SEQ ID NO. 4). Von Suzuki, EMBO J. 8 (1989), 797 - 804 (wobei der Inhalt dieser Veröffentlichung Gegenstand der Offenbarung

ist) wurde beispielsweise gezeigt, daß ein Fragment des Aminoterminus des A1-Histons von Seeigelsperma 6 SPKK-repeats (S6-Peptid) sowie ein S2-Peptid, welches zwei repeats enthält, an AT-reiche DNA-Sequenzen bindet.

Reeves und Nissen, J. Biol. Chem. 265 (1990), 8573 - 8582, wobei der Inhalt dieser Veröffentlichung Gegenstand der Offenbarung ist, zeigten, daß ein Konsensuspeptid aus HMG-1 non-Histon-chromosomales Protein A mit der Sequenz TPKRPRGRPKK (SEQ ID NO. 5) an AT-reiche DNA-Sequenzen bindet. Eine verkürzte Version dieses Peptids (KRPRGRPK, SEQ ID NO. 6, nicht jedoch PRGRP, SEQ ID NO. 7) bindet ebenfalls an DNA.

Ebenso bekannt sind  $\alpha$ -helicale Elemente von Proteinen, die an DNA binden. Eine derartige Region des E.coli-Proteins RecA ist in Zlotnick und Brenner, J. Mol. Biol. 209 (1989) 6551 - 6561 beschrieben, wobei der Inhalt dieser Veröffentlichung Gegenstand der Offenbarung ist. Ein 24-Aminosäurenprotein des Aminoterminus von RecA hat eine  $\alpha$ -helicale Struktur und bindet vorzugsweise an einzelsträngige DNA.

Eine Sequenzfolge, die häufig am Carboxyterminus des Histons H1 auftritt, ist das Alanin/Lysin-Motiv. Eine Variante des Histons H1 aus Seeigelsperma hat ein 57-Aminosäure großes Segment, welches Alanin und Lysin reich und frei von Prolinresten ist. Es ist am Carboxyterminus unmittelbar nach der globulären Domäne lokalisiert und bei Wells and McBride, Nucleic Acids Res. 17 (1989) r311 - r346 und Hill et al., EMBO J. 8 (1989), 2591 - 2599 beschrieben, wobei der Inhalt dieser Publikationen Gegenstand der Offenbarung ist. CD-Experimente haben gezeigt, daß dieses Segment in Lösung helical strukturiert ist und an doppelsträngig DNA bindet (Hill 1989). Die

Verteilung basischer Reste in der  $\alpha$ -Helix unterscheidet sich von der Verteilung im RecA-Peptid. Die basischen Reste sind an zwei gegenüberliegenden Seiten der Helix lokalisiert. Dazwischen, insbesondere auf einer Seite, sind Clusters von Alanin-Resten zu finden. Da damit auf gegenüberliegenden Seiten basische Reste konzentriert sind, verbrückt dieses Motiv bevorzugt zwei doppelsträngige helicale DNA-Segmente.

Ein weiteres DNA-Bindeprotein, welches ein  $\alpha$ -helicales Segment zur DNA-Erkennung verwendet, ist Serumamyloid P (SAP), ein Mitglied der Pentraxin-Familie (Turnell et al., FEBS Lett. 232 (1988), 263 - 268, wobei der Inhalt dieser Veröffentlichung Gegenstand der Offenbarung ist.). SAP bindet sowohl an DNA als auch Nukleosomen-Core-Regionen. Proteinsequenzen aus anderen Pentraxinen und Histonen können ebenfalls identifiziert werden als DNA-Bindedomänen. Eine Konsensussequenz, welche sowohl in Pentraxinen als auch Histonen enthalten ist, ist

P-V(RK)(KR)(SGA)L(RK)(KNQ)G

Dieser Konsensus ist bei Turnell (1988) beschrieben. Es wird vermutet, daß die drei oder vier basischen Reste, welche auf einer Seite der Helix liegen, so positioniert sind, daß sie mit zwei Phosphatresten der DNA eines Strangs binden können und zwei andere Reste an einen anderen Strang binden, so daß eine käfigartige Struktur entsteht. Diese Peptide binden bevorzugt an AT-reiche Sequenzen (Churchill and Travers, Trends Biochem. Sci. 16 (1991), 92 - 97, wobei der Inhalt dieser Veröffentlichung Gegenstand der Offenbarung ist.).

Schließlich finden sich Basissequenzen in einigen regula-

torischen DNA-Bindeproteinen, wie z. B. GCN4 (Leucin-zipper und Helix-loop-Helixmotive), die eine  $\alpha$ -helicale Struktur besitzen (Talanian et al., FEBS Lett. 232 (1988), 263 - 268, wobei der Inhalt dieser Veröffentlichung Gegenstand der Offenbarung ist.).

Ebenfalls als Nukleinsäurebindeproteine sind Zink-ligiert Proteine bekannt. Bisher sind mindestens vier verschiedenen Gruppen zinkbindender Proteindomänen bekannt. Die erste ist die Gruppe des klassischen "Zinkfingers", ein etwa 30 Aminosäure großer Modul mit einem Zinkion, welches über zwei Cysteine und zwei Histidine ligiert ist (Miller et al., EMBO J. 4 (1985), 1609 - 1614, Brown et al., FEBS Lett. 186 (1985), 271 - 274, wobei der Inhalt dieser Publikationen Gegenstand der Offenbarung ist.). Beispielsweise ist in TFIIA ein Sequenzmotiv von 30 Aminosäuren neunmal wiederholt. Das Zinkfingermotiv ist durch vier Metalliganden definiert (Konsensus Cys-X<sub>2-5</sub>, Cys-X<sub>12,13</sub>-His-X<sub>2-5</sub>-His) und drei konservierten hydrophoben Resten. Zweidimensionale NMR-Studien (Lee et al., Science 245 (1989), 635 - 637, Neuhaus et al., FEBS Lett. 262 (1990), 179 - 184, wobei der Inhalt dieser Publikationen Gegenstand der Offenbarung ist.

) zeigten, daß jedes der 30 Reste großen Motive zu einer unabhängigen Domäne mit einem einzigen Zinkion, vierfach komplexgebunden, faltet, welches zwischen ein antiparalleles  $\beta$ -Sheet und eine kurze  $\alpha$ -Helix eingelagert werden kann.

Die zweite zinkenthaltende Domäne ist eine etwa 80 Aminosäure große Domäne, welche in den Rezeptoren für Steroide und hormonähnliche Moleküle gebunden wird. Diese Domäne enthält zwei Zinkionen. Jedes Zinkion ist über vier

Cysteine ligiert (Freedman et al., Nature 334 (1988), 543 - 546, wobei der Inhalt dieser Veröffentlichung Gegenstand der Offenbarung ist.). Im Gegensatz zu dem C<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>-Zinkfingermotiv fehlen konservierte hydrophobe Reste, und der Abstand zwischen den zwei Motiven ist etwas größer (15 Reste im Vergleich zu ca. 4 bis 8 bei TFIIA).

Ein Vergleich der Strukturen der DNA-Bindedomänen des Glucokortikoid und Estrogenrezeptors (Härd et al., Science 249 (1990), 157 - 160, Schwabe et al., Nature 348 (1990) 458 - 461 wobei der Inhalt dieser Publikationen Gegenstand der Offenbarung ist.) mit dem klassischen C<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>-Zinkfingern zeigt, daß die sekundäre und tertiäre Struktur sich unterscheiden.

Die dritte Domäne wird in Hefeaktivatoren, wie z. B. GAL4, gefunden. Diese Domänen enthalten zwei engbenachbarte Zinkionen, die über 6 Cysteine komplexiert sind (Pan und Coleman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 2077 - 2081, wobei der Inhalt dieser Veröffentlichung Gegenstand der Offenbarung ist.). Die DNA-Bindedomäne ist am Aminoterminus lokalisiert. Die Reste 1 - 74 sind ausreichend für die Erkennung und ein etwas größeres Fragment (1 - 147) enthält weitere Stellen, welche die spezifische Affinität erhöhen.

Die sog. GATA-Bindeproteine, welche den hämotopoetischen Regulationsfaktor GATA-1 einschließen, enthalten eine vierte Klasse von zinkhaltigen Domänen, welche DNA erkennen und binden (Orkin, Cell 63 (1990), 665 - 672, wobei der Inhalt dieser Veröffentlichung Gegenstand der Offenbarung ist.).

Weiter sind zwei verschiedene Klassen von zinkhaltigen

Proteindomänen bekannt, welche RNA erkennen. Der erste Typ wird in den retroviralen gag-Proteinen gefunden, welche an virale genomische RNA bindet (Surovoy et al., J. Mol. Biol. 229 (1993), 94 - 104, wobei der Inhalt dieser Veröffentlichung Gegenstand der Offenbarung ist). Analoges gilt für das tat-Protein von verschiedenen Retroviren, wie z. B. HIV (Frankel et al., Science 249 (1988), 70 - 73, wobei der Inhalt dieser Veröffentlichung Gegenstand der Offenbarung ist).

Schließlich ist eine Vielzahl weiterer nukleinsäurebindender Proteine bekannt, welche nicht in diese Klassen einordnbar sind, deren nukleinsäurebindenden Motive jedoch für die Erfindung geeignet sind. Beispielsweise sind dies der Heat-shock-factor, virale Aktivatoren, Nukleokapsidproteine von Viren. Eine weitere Gruppe sind die sog. Genom-linked-Proteine (VPg), welche in Pikornaviren enthalten sind und kurze Peptide (20 - 25 Aminosäuren), z. B. VPg3 aus dem Maul- und Klauenseuchenvirus, GPYEGPVKKPVALKVAKNLIVTE (SEQ ID NO. 8), welches kovalent an RNA bindet, wobei statt M auch N geeignet ist. Diese Peptide sind jedoch auch in der Lage, mit Nukleinsäuren ionisch zu wechselwirken.

Falls erster und zweiter Ligand Peptide sind, ist es vorteilhaft, wenn der erste Ligand 2 - 100, der zweite Ligand 2 - 20, der dritte Ligand 3 - 100 und das Nukleinsäure-transferpeptid 10 - 250 Aminosäuren lang sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform kann das erfindungsgemäße Nukleinsäure-transferpeptid ein vierter Peptid oder Lipid enthalten, welches die Auflösung der bei der Endozytose entstandenen Endosomen beschleunigt und vorzugsweise 10 - 40 Aminosäuren lang ist. Geeignete Peptide sind

beispielsweise beschrieben in Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 7934 - 7938 und Kamata et al., Nucl. Acid. Res. 22 (1994), 536 - 537, wobei der Inhalt dieser Publikationen Gegenstand der Offenbarung ist.

Die Herstellung der Nukleinsäure-transferpeptide erfolgt nach den dem Fachmann geläufigen Methoden. Falls es sich um ein reines Peptid handelt, können die üblichen Methoden zur Peptidsynthese angewendet werden. Üblicherweise wird hierzu die das C-terminale Ende bildende Aminosäure an einen Träger gebunden, vom C-Terminus das Peptid schrittweise aufgebaut und dieses anschließend vom Träger abgespalten.

Im einzelnen wird dazu eine Aminosäure, beispielsweise über ihre Carboxygruppe an ein unlösliches, leicht filterbares Polymer gebunden und dann vom C-terminalen Ende her die Peptidkette schrittweise aufgebaut. Zu diesem Zweck wird eine N-geschützte Aminosäure mit einer reaktiven Gruppe eines Kunstharzes zur Reaktion gebracht. Von der am Trägerpartikel kovalent verankerten Aminosäure wird die N- $\alpha$ -Schutzgruppe entfernt und das resultierende Aminoacylpolymer mit der nächsten N-geschützten Aminosäure umgesetzt. Von dem am Trägerharz kovalent gebundenen Dipeptid wird die N- $\alpha$ -Schutzgruppe entfernt und das resultierende Aminoacylpolymer mit der nächsten N-geschützten Aminosäure umgesetzt. Alle überschüssigen Reagentien und Beiprodukte werden durch einfaches Filtrieren entfernt. Ist die gewünschte Peptidsequenz auf diese Weise hergestellt, wird die kovalente Bindung zwischen der C-terminalen Aminosäure und der Ankergruppe des polymeren Trägers gespalten. Der unlösliche Träger wird durch einfache Filtration von dem in Lösung befindlichen Peptid entfernt. Das Peptid kann mittels chromatographischer Methoden

gereinigt werden. Derartige Verfahren sind beispielsweise bei Merryfield, JACS 85 (1964) 2146, wobei der Inhalt dieser Veröffentlichung Gegenstand der Offenbarung ist, beschrieben. Dabei kann das gewünschte Peptid auch in Fragmenten synthetisiert und die Fragmente durch Peptidbindungen ligiert werden.

Ebenso können die Peptide rekombinant, durch die dem Fachmann geläufigen Methoden, hergestellt werden.

Die Bindung von nicht peptidischen Liganden und Zell-oberflächen-integrierenden Substanzen (z. B. Kohlenhydrate, Lipide, Vitamine, Steroide) kann nach Synthese des Peptidanteils des erfindungsgemäßen Peptids oder während der Synthese des Peptidanteils erfolgen. Zur Bindung an Peptide werden die Liganden und Substanzen vorher zweckmäßig aktiviert. Geeignete Aktivierungsreagenzien sind dem Fachmann bekannt, beispielsweise kann Di-cyclohexyl-carbodiimid verwendet werden. Zweckmäßig werden Carbonylgruppen der Liganden und Substanzen in Aktivester modifiziert.

Ein erfindungsgemäßer Komplex kann verwendet werden zur Herstellung eines Therapeutikums zur Behandlung von viralen Infektionen, zur Gentherapie, zur Stimulierung der Immunreaktion gegen maligne Zellen bzw. Tumoren, zur Expression von Faktoren (Proteine), zur Zellmarkierung und zur Zell-Integration von Genen, welche für Proteine codieren, die in die Zelloberfläche integriert werden.

Zur Herstellung eines Therapeutikums wird der Komplex aus nukleinbindendem Peptid und DNA nach den dem Fachmann geläufigen Methoden in eine applizierbare Form überführt. Falls der Komplex intramuskulär oder subkutan gegeben

werden soll, kann er beispielsweise in physiologischer Kochsalzlösung gelöst sein. Zur intranasalen oder intraokularen Applikation kann das Therapeutikum beispielsweise in Form eines Sprays oder einer wässrigen Lösung angewendet werden. Für lokale oder orale Gaben ist es häufig erforderlich, das Therapeutikum gegen Inaktivierung zu schützen, beispielsweise gegen proteolytische Enzyme in der Mundhöhle oder im Magen. Ein derartiger vorübergehender Schutz kann beispielsweise durch Verkapselung der erfindungsgemäßen Peptide (Komplexe) erfolgen. Die Verkapselung kann beispielsweise durch Überziehen mit einem Schutzmantel (Mikroverkapselung oder Einbettung einer Vielzahl von erfindungsgemäßen Peptiden (Komplexen) in einen schützenden Träger (Makroverkapselung)) erfolgen.

Das Verkapselungsmaterial kann semipermeabel sein oder beim Einbringen in den menschlichen oder tierischen Körper semipermeabel werden. Üblicherweise wird für die Verkapselung eine biologisch abbaubare Substanz als Träger verwendet.

Die Applikation der erfindungsgemäßen Peptide (Komplexe) kann durch die dem Fachmann geläufigen Methoden erfolgen, beispielsweise intradermal, intramuskulär, intraperitoneal, intravenös, subkutan, intranasal, in die Liquorräume oder direkt in Tumorgewebe.

Die nachfolgenden Publikationen, Beispiele, Tabellen, das Sequenzprotokoll und die Abbildung erläutern die Erfindung weiter.

Tabelle 3 zeigt verschiedene Peptide, die in Teilsequenzen hergestellt und anschließend ligiert wurden, und deren Bindungskonstanten für verschiedene Nukleinsäuren.

**Tab. 3**

**Die einzelnen Peptide entsprechen folgenden SEQ ID NO:**

F136-NCp7	-	SEQ ID NO: 17
F136-1-35	-	SEQ ID NO: 18
AcRGD-1-35	-	SEQ ID NO: 19
F136-1-Sp-35	-	SEQ ID NO: 20
AcRGD-1-Sp5	-	SEQ ID NO: 21
AcRGD-branched-1-Sp-35-	-	SEQ ID NO: 22
CD4-1-Sp-35	-	SEQ ID NO: 23
AcRGD-VPg	-	SEQ ID NO: 24

Tabelle 4 zeigt bevorzugte Peptide, die als Liganden geeignet sind (nach Robbins, Cell 64 (1991), 615 - 623).

Tabelle 5 zeigt weitere Beispiele für Peptidliganden (1 + 3).

**Tab. 5**

Fusion-1-Sp-35	-	SEQ ID NO: 25
AcRGD-Fusion-1-Sp-35	-	SEQ ID NO: 26
AcRGD-NLS-1-Sp-35	-	SEQ ID NO: 27
branched-AcRGD-NLS-1-Sp-35	-	SEQ ID NO: 28
Galactoxyl-branched-1-Sp-35-	-	SEQ ID NO: 29

Fig. 1 zeigt ein an Östrogen gekoppeltes Peptid (SEQ ID NO: 30), das als Ligand (1 + 3) geeignet ist.

Aldovini, A. & Young, R. A. (1990). Mutations of RNA and protein sequences involved in HIV-1 packaging in production of noninfectious virus. *J. Virol.* 64, 1920 - 1926.

Anfossi, G., Gewirtz, A. M. & Calabretta, B. (1989). An oligomer complementary to c-myb-encoded mRNA inhibits proliferation of human myeloid leukemia cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 86, 3379 - 3383.

Barat, C., Lullien, V., Schatz, O., Keith, G., Nugeyre, M. T., Grüninger-Leitch, F., Barré-Sinoussi, F., LeGrice, S. F. J., Darlix, J. L. (1989). HIV-1 reverse transcriptase specifically interacts with the anticodon domain of its cognate primer tRNA. *EMBO J.* 8, 3279 - 3285.

Berg, J. M. (1986). Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins. *Science*, 232, 485 - 487.

Bess, J. W., Powell, P. J., Issaq, H. J., Schumack, L. J., Grimes, M. K., Henderson, L. E., Arthur, L. O. (1992). Tightly bound zinc in human immunodeficiency virus type 1, human T-cell leukemia virus type I, and other retroviruses. *J. Virol.* 66, 840 - 847.

Boone, L. R. & Skalka, A. M. (1981). Viral DNA synthesized in vitro by avian retrovirus particles permeabilized with mellitin. *J. Virol.* 37, 109 - 116.

Chen, M. J., Garon, C. F., Papas, T. S. (1990). Native ribonucleoprotein is an efficient transcriptional complex of avian myeloblastosis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 77, 1296 - 1300.

Dyson, H. J., Rance, M., Houghten, R. A., Wright, P. E. & Lerner, R. A. (1988). Folding of immunogenic peptide fragments of proteins in water solution. *J. Mol. Biol.* 201, 201 - 217.

- Gorelick, R. J., Henderson, L. E., Hanser, J. P., and Rein, A. (1988). Point mutants of Moloney murine leukemia virus that fail to package viral RNA: evidence for specific RNA recognition by a "zinc finger-like" protein sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 85, 8420 - 8424.
- Gorelick, R. J., Nigida, S. M., Bess, J. W., Arthur, L. O., Henderson, L. E., Rein, A. (1990). Noninfectious human immunodeficiency virus type 1 mutants deficient in genomic RNA. *J. Virol.* 64, 3207 - 3211.
- Hynes, R. O. (1992). Integrins:versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69, 11 - 25.
- Karpel, R. L., Henderson, L. E., and Oroszlan, S. (1987). Interactions of retroviral structural proteins with single- stranded nucleic acids *J. Biol. Chem.* 262, 4961 - 4967.
- Khan, R. & Giedroc, D. P. (1992). Recombinant human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid (NCp7) protein unwinds tRNA. *J. Biol. Chem.* 267, 6689 - 6695.
- Maurer, B., Bannert, H., Darai, G., Flügel, R. M. (1988). Analysis of the primary structure of the long terminal repeat and the gag and pol genes of the human spumaretrovirus. *J. Virol.* 62, 1590 - 1597.
- Meric, C. & Goff, S. P. (1989). Characterization of Moloney murine leukemia virus mutants with single amino acid substitutions in the cys-his box of the nucleocapsid protein. *J. Virol.* 63, 1558 - 1568.
- Omichinski, J. G., Clore, G. M., Sakaguchi, K., Appella, E. & Gronenborn, A. M. (1991). Structural characterization of a 39-residue synthetic peptide containing the two zinc binding domains from the HIV-1 p7

nucleocapsid protein by CD and NMR spectroscopy. *FEBS Letters*, **292**, 25 - 30.

Prats, A. C., Sarih, L., Gabus, C., Litvak, S., Keith, G., Darlix, J.L. (1988). Small finger protein of avian and murine retroviruses has nucleic acid annealing activity and positions the replication primer tRNA onto genomic RNA. *EMBO J.* **7**, 1777 - 1783.

Prats, A. C., Housset, V., de Billy, G., Cornille, F., Prats, H., Roques, B., Darlix, J. L. (1991). Viral RNA annealing activities of the nucleocapsid protein of Moloney murine leukemia virus are zinc independent. *Nucleic Acids Res.* **19**, 3553 - 3541.

South, T. L., Blake, P. R., Sowder, R. C., Arthur, L. O., Henderson, L. E., Summers, M. F. (1990). The nucleocapsid protein isolated from HIV-1 particles binds zinc and forms retroviral-type zinc fingers. *Biochemistry*, **29**, 7786 - 7789.

South, T. L., Blake, P. R., Hare, D. R., Summers, M. F. (1991). C-terminal retroviral-type zinc finger domain from the HIV-1 nucleocapsid protein is structurally similar to the N-terminal zinc finger domain. *Biochemistry*, **30**, 6342 - 6349.

Summers, M. F., South, T. L., Kim, B., Hare, D. R. (1990). High- resolution structure of an HIV zinc fingerlike domain via a new NMR-based distance geometry approach. *Biochemistry*, **29**, 329 - 340.

Summers, M. F., Henderson, L. E., Chance, M. R., Bess, J. W., South, T. L., Blake, P. R., Sagi, I., Perez-Alvarado, G., Sowder, R. C., Hare, D. R., Arthur, L. O. (1992). Nucleocapsid zinc fingers detected in retroviruses: EXAFS studies of intact viruses and the solution-state structure of the nucleocapsid protein from HIV-1. *Protein Science*, **1**, 563 - 574.

Urry, D. W., Masotti, L. & Krivacis, J. R. (1971). Circular dichroism of biological membranes. I. Mitochondria and red blood cells. *Biochem. Biophys. Acta*, 241, 600 - 612.

Woody, R. W. (1985). Circular dichroism of peptides. In *The Peptides* (Hruby, V. J., ed.), vol. 7, pp. 15 - 114, Academic Press, Orlando.

De Robertis, E. M., Longthorne, R. F., and Gurdon, J. B. (1978). Intracellular migration of nuclear proteins in *Xenopus* oocytes. *Nature* 272, 254 - 256.

Dingwall, C., Sharnick, S. V., and Laskey, R. A. (1982). A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus. *Cell* 30, 449 - 458.

Garcia-Bustos, J., Heitman, J., and Hall, M. N. (1991). Nuclear protein localization. *Biochim. Biophys. Acta*

Greenspan, D., Palese, P., and Krystal, M. (1988). Two nuclear location signals in the influenza virus NS1 non-structural protein. *J. Virol.* 62, 3020 - 3026.

Hall, M. N., Hereford, L., and Herskowitz, I. (1984). Targeting of *E. coli* b-galactosidase to the nucleus in yeast. *Cell* 36, 1057 - 1065.

Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D., and Smith, A. E. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39, 499 - 509.

Kleinschmidt, J. A., and Seiter, A. (1988). Identification of domains involved in nuclear uptake and histone binding of protein N1 of *Xenopus laevis*. *EMBO J.* 7, 1605 - 1614.

Lanford, R. E., and Butel, J. S. (1984). Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. *Cell* 37, 801 - 813.

Lyons, R. H., Ferguson, B. Q., and Rosenberg, M. (1987). Pentapeptide nuclear localization signal in adenovirus E1a. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2451 - 2456.

McVey, D., Brizuela, L., Mohr, I., Marshak, D. R., Gluzman, Y., and Beach, D. (1989). Phosphorylation of large tumor antigen by cdc2 stimulates SV40 replication. *Nature* 341, 503 - 507.

Morin, N., Delsert, C., and Klessig, D. F. (1989). Nuclear localization of the adenovirus DNA binding protein: requirement for two signals and complementation during viral infection. *Mol. Cell. Biol.* 9, 4372 - 4380.

- Nath, S. T., and Nayak, D. P. (1990). Function of two discrete regions is required for nuclear localization of polymerase basic protein 1 of A/WSN/33 influenza virus (H1 N1). *Mol. Cell. Biol.* 10, 4139 - 4145.
- Picard, D., and Yamamoto, K. R. (1987). Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 6, 3333 - 3340.
- Picard, D., Salser, S. J., and Yamamoto, K. R. (1988). A movable and regulable inactivation function within the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor. *Cell* 54, 1073 - 1080.
- Picard, D., Kumar, V., Chambon, P., and Yamamoto K. (1990). Signal transduction by steroid hormones:nuclear localization is differentially regulated in estrogen and glucocorticoid receptors. *Cell Regul.* 1, 291 - 299.
- Richardson, W. D., Roberts, B. L., and Smith, A. E. (1986). Nuclear location signal in polyoma virus large-T-antigen. *Cell* 44, 77 - 85.
- Rihs, H.-P., and Peters, R. (1989). Nuclear transport kinetics dependent on phosphorylation-site-containing sequences flanking the karyophilic signal of the simian virus 40 T-antigen. *EMBO J.*, 1479 - 1484.
- Rihs, H.-P., Jans, D. A., Fan, H., and Peters, R. (1991). The rate of nuclear cytoplasmic protein transport is determined by the casein kinase II site flanking the nuclear localization sequence of the SV40 T-antigen. *EMBO J.* 10, 633 - 639.
- Robbins, J., Dilworth, S. M., Laskey, R. A., and Dingwall, C. (1991). Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targetin sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 64, 615 - 623.
- Sanchez, E. R., Toft, D. O., Schlesinger, M. J., and Pratt, W. B. (1985). The 90kD non-steroid binding phosphoprotein that binds to the untransformed glucocorticoid receptor in molybdate-stabilized L-cell cytosol is the murine 90kD heat shock protein. *J. Biol. Chem.* 260, 12398 - 12401.
- Yamasaki, L., Kanda, P., and Lanford, R. (1989). Identification of four nuclear transport signal-binding proteins that interact with diverse transport signals. *Mol. Cell. Biol.* 9, 3028 - 3036.

Beispiel 1**Peptidsynthese**

Die Peptide wurden mittels Fmoc (Fluorenyloxycarbonyl)-Festphasensynthese hergestellt. Die Synthese erfolgt an einem Peptidsynthesizer ABI 430A (Applied Biosystems). Das Peptid wurde an 0,4 g SASRIN-Harz, beginnend mit Fmoc-derivatisiertem Glycin durchgeführt. Die Fmoc-Gruppen wurden jeweils mit 25 % Piperidin in DMF abgespalten. Die Bindung der weiteren Fmoc-geschützten Aminosäuren (5 Äquivalente) wurden schrittweise durchgeführt.

Die Freisetzung des Peptids vom Harz erfolgte mit 1 % Trifluoressigsäure in Dichlormethan in 15 Minuten bei Raumtemperatur. Die Filtrate werden gesammelt, mit Dichlormethan gewaschen und durch Zugabe von Diethylether präzipitiert. Eine Nachfällung aus Ethylacetat/Diethylether ergibt das Fmoc-geschützte Peptid.

**1.1 Fmoc-136-156-Gly-1-55 Peptid****a) Synthese des NCP7-1-55-Peptid**

Das N-terminale Fragment von Fmoc-1-19 wurde an einem Fmoc-Gly-Sasrin-Harz (0.4 g, 0.7mmol/g; Bachem) synthetisiert. Nach Behandlung des Harzes mit 25% Piperidin in Dimethylformamid (DMF) zur Abspaltung der Fmoc Gruppe, wurde jede Fmoc-Aminosäure (5 Äquivalent) nacheinander mit Hilfe von O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium tetrafluorborate (TBTU) / 1-Hydroxybenzotriazol (HOt) / Diisopropylethylamin

(DIPEA) (5:5:7.5 Äquiv.) eingeengt. Das mittlere Fragment Fmoc-20-35 wurde nach dem gleichen Syntheseplan synthetisiert. Zur Einführung von Fmoc-Ala<sup>30</sup> wurde eine Doppelkupplung benutzt. Das geschützte Fragment wurde mit 1% Trifluoressigsäure (TFA) in Dichlormethan (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) (6 x 15 min) abgespalten. Die Filtrate wurden gesammelt, mit Pyridin neutralisiert und aus Diethylether gefällt. Die folgenden erneuten Fällungen aus dem Ethylacetat/ Diethylethergemisch ergaben die gewünschten geschützten Fragmente mit einer Ausbeute von 63% bzw. 65%. Ein vollgeschütztes C-terminales Fragment Fmoc-36-55 wurde am Fmoc-Asn(Trt)-Wang-Harz (0.64 g, 0.39 mmol/g) aufgebaut. Es wurden 6 Äquivalente jeder Aminosäure und die TBTU/HOBt-Aktivierungsmethode benutzt. Doppelkupplungen wurden für Fmoc-Gln(Trt)-OH in Position 45 und Fmoc-Arg(Pmc)-OH in Position 52 angewandt. Das mittlere Fragment Fmoc-20-35 (0.1 mmol, 360 mg) wurde zusammen mit äquivalenten Mengen von TBTU und HOBt und 0.15 mmol DIPEA wurden in 1 ml DMF gelöst. Nach 20 min wurde das Reaktionsgemisch zu dem 36-55-Peptid-Harz (0.036 mmol, 250 mg) gegeben. Nach 4 Stunden wurde das Harz vorsichtig gewaschen. Das N-terminale Fragment Fmoc-1-19 (0.08 mmol, 390 mg in 1 ml DMF) wurde unter gleichen Bedingungen voraktiviert und über Nacht mit dem 20-55-Peptid-Harz gekuppelt. Schließlich wurden 0.52 g des Fmoc-1-55-Peptid-Harzes erhalten. Ein Teil dieses Peptid-Harzes wurde für eine Peptidabspaltung verwendet. Das 1-55-Peptid wurde mit einer Mischung von m-Cresol:Dimethylsulfid:Ethandithiol:TFA (Trifluoressigsäure) (3:3:3:91 v/v) für 2 Stunden bei 20°C abgespalten. Das erhaltene Peptid wurde aus der Mischung gefällt, mit Diethylether (x 5) gewaschen, in Wasser gelöst und lyophilisiert. Weitere halbpräparative HPLC Reinigung (HPLC an Nucleosil C18-Säul 8 x

250 mm, Gradientenelution) des Rohpeptids resultierte in HPLC reinem NCp7-1-55 Peptid mit der Ausbeute von 40% der Theorie (ausgehend von Asn<sup>55</sup> Harzbeladung). Analyse: ES-MS - 6443.5 (calc. 6444.54); RP HPLC Rt-13.32 min (Nucleosil C18 4.6\*150 mm; Gradient 10-70% B in A in 30 min; B = 0.1% TFA in AcN; A = 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O).

- b) Das geschützte Peptidfragment Fmoc-136-156-Gly-OH wurde auf die gleiche Weise wie das oben beschriebene Fragment erhalten (1.a). 0.011 mmol (50 mg in 300 ml DMF) von Fmoc-136-156-Gly-OH wurde innerhalb von 15 Stunden in einem DMF-Medium, dem TBTU/HOBt zugemischt wurde, an das 1-55-Peptid-Harz (0.0034 mmol, 50 mg) gekuppelt. Schließlich wurden 63 mg des Fmoc-136-156-Gly-1-55-Peptid-Harz erhalten. Das erhaltene Peptid wurde unter den gleichen Bedingungen abgespalten und gereinigt, sodaß HPLC-reines Peptid (11.5 mg; Ausbeute: 38%) erhalten wurde. Analyse: ES-MS - 9044.8+1.5 (calc.: 9046.53); RP HPLC Rt-21.22 min (Nucleosil C18 4.6\*150 mm; Gradient 10-70% B in A in 30 min; B = 0.1% TFA in ACN; A = 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O).

### 1.2. Fmoc-136-156-Gly-1-35 Peptid

Fmoc Gly-Sasrin-Harz (100mg, 0.65mmol/g) wurde nacheinander mit 7 Äquivalent (0.45 mmol) von jeder Fmoc-Aminosäure mit Hilfe der TBTU/HOBt/DIPEA Aktivierungsmethode acyliert. Ein Teil des 1-35- Peptid- Harz wurde wie in 1.a. abgespalten. 1-35-Peptid wurde HPLC gereinigt (Ausbeute: 55%).

Analyse: ES-MS - 4109.19+0.2 (calc.: 4109.86); RP HPLC Rt-

12.89 min (Nucleosil C18 4.6+150 mm; Gradient 10-70 % B in A in 30 min; B = 0.1% TFA in ACN; A = 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O).

- b) 1-35-Peptid-Harz (50 mg, 0.005 mmol) wurde mit 3 Äquivalent (0.015 mmol, 67 mg) von Fmoc-136-156-Gly-OH geschütztem Peptidfragment nach der Methode wie in 1.b. beschrieben, acyliert. Nach HPLC-Reinigung wurde des HPLC reines Peptid erhalten (Ausbeute: 13 mg, 52%).

Analyse: ES-MS - 6709+1.5 (calc.: 6710.83); RP HPLC Rt-21.2 min (Nucleosil C18 4.6\*150 mm; Gradient 10-70 % B in A in 30 min; B = 0.1% TFA in ACN; A = 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O).

### 1.3 Ac-GRGDSPGSG-1-35 Peptid (SEQ ID NO: 9)

- a) 10 g von 2-Chlortriylchlorid-Harz (1.4 mmol/g; Novabiochem) wurde mit 1.5 äquiv. Fmoc-Gly-OH unter Standardbedingungen acyliert. Der Substitutionsgrad war 0.65 mmol/g. 200 mg (0.13 mmol) des erhaltenen Harzes wurde nacheinander wie in 2.a. beschrieben acyliert. Die Fmoc-Gruppe wurde entfernt und das Peptid-Harz mit Acetanhydrid acyliert. Das geschützte Peptidfragment Ac-GRGDSPGSG wurde vom Harz abgespalten, indem es 1 Stunde mit einem Gemisch aus Essigsäure/Trifluorethanol/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:2:7 v/v) behandelt wurde. Die Filtrate wurden gesammelt und das Lösungsmittel wurde zur Trockene im Vakuum eingedampft. Das Peptid wurde aus tert.-Butylalkohol/Wasser (4:1, v/v) lyophilisiert.
- b) 1-35-Peptid-Harz (32 mg, 0.0032 mmol) wurde innerhalb von 15 h mit 0.0064 mmol (8.1 mg in 100 ml DMF) des Ac-GRGDSPGSG-OH geschützten Fragments, das mit

TBTU/HOBt voraktiviert wurde, gekuppelt. Das Peptid-Harz wurde wie in 1.b. beschrieben aufgearbeitet. Schließlich wurden 8.6 mg HPLC reines Peptid erhalten (Ausbeute: 55%).

Analyse: ES-MS - 4920.91+1.75 (calc.: 4922.65); RP HPLC Rt-13 min (Nucleosil C18 4.6\*150 mm; Gradient 10-70 % B in A in 30 min; B = 0.1% TFA in ACN; A = 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O).

#### 1.4 Fmoc-136-156-Gly-1-Sp-35 Peptid

- a) Fmoc-Gly-Wang-Harz (210 mg, 0.52 mmol/g; Novabiochem) wurde nacheinander mit 10 Äquival. (1 mmol) von jeder Fmoc-Aminosäure, die nach der TBTU/HOBt/DIPEA Methode aktiviert wurde, acyliert. Eine Substanzprobe von 1-SP-35-Peptid-Harz (40 mg) wurde abgespalten wie in 1.a. beschrieben. Nach der HPLC-Reinigung wurden 10.5 mg 1-SP-35-Peptid erhalten (Ausbeute: 73%).  
Analyse: ES-MS - 2701.14+1 (calc.: 2702); RP HPLC Rt-13.7 min (Nucleosil C18 4.6\*150 mm; Gradient 10-70 % B in A in 30 min; B = 0.1% TFA in ACN; A = 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O).
- b) 1-Sp-35-Peptid-Harz (30 mg, 0.004 mmol) wurde mit 3 Äquivalenten des geschützten Fragments Fmoc-136-156-Gly-OH acyliert wie unter 1.b. beschrieben. Das erhaltene Peptid wurde abgespalten und aufgearbeitet wie unter 1.a. beschrieben. Ausbeute: 12.7 mg, 60% der Theorie; HPLC reines Produkt.  
Analyse: ES-MS-5302.4 + 1.5 ( berechnet 5303.21 );RP HPLC Rt-21.29 min (Nucleosil C18; 4.6\*150 mm ; Gradient 10-70% B in A in 30 min; B=0.1% Trifluoresigsäure in Acetonitril; A=0.1% Trifluoressigsäure in Wasser ).

### 1.5 Ac-GRGDSPGSG-1-Sp-35 Peptid

1-Sp-35-Peptid-Harz (50 mg, 0.0067 mmol), wie beschrieben unter 4.a., wurde mit 2 Äquivalenten (17 mg, 0.0135 mmol) Ac-GRGDSPGSG wie unter 3.b. beschrieben, umgesetzt. Das resultierende Peptid wurde abgespalten vom Harz, von den Schutzgruppen befreit und aufgearbeitet wie oben beschrieben. Ausbeute: 14 mg, 61% der Theorie, HPLC-rein.

Analyse: ES-MS-3514.5+0.7 ( berechnet 3515.24 ); Rp HPLC Rt-14.9 min (Nucleosil C18; 4.6\*150 mm ; Gradient 10-40% B in A innerhalb von 30 min; B=0.1% Trifluoressigsäure in Acetonitril; A=0.1% Trifluoressigsäure in Wasser ).

### 1.6 Ac-GRGDSPGSG-PKKRKVPGSG-1-Sp-35 Peptid

a) Ausgehend von Fmoc-Gly-Sasrin-Harz (200 mg) wurde das in den Seitenkettenfunktionen geschützte Fragment Fmoc-PKKRKVPGSG-OH (SEQ ID NO.10) schrittweise aufgebaut wie unter 2.a. beschrieben. Die Abspaltung vom Harz erfolgte wie unter 1.b. beschrieben.

b) 1-Sp-35-Harz (50 mg, 0.0067 mmol) wurde mit 3 Äquivalenten geschütztem Fragment Fmoc-PKKRKVPGSG-OH (42 mg, 0.02 mmol) voraktiviert mit TBTU/HOBt in Dimethylformamid 150 ml innerhalb von 5 h acyliert. Die Fmoc-Gruppe wurde abgespalten und das Peptid-Harz wurde mit 2 Äquivalenten Ac-GRGDSPGSG-OH (17 mg, 0.0134 mmol) 15 h wie unter 3.b. beschrieben umgesetzt. Nach Abspaltung und Reinigung resultierte HPLC-reines Peptid. Ausbeute: 25 mg, 80% der Theorie.

Analyse: ES-MS-4677+2 ( berechnet 4678.43); RP HPLC Rt-15.16 min (Nucleosil C18; 4.6\*150 mm ; Gradient 10-40% B in A innerhalb von 30 min; B=0.1% Trifluoressigsäure in Acetonitril; A=0.1% Trifluoressigsäure in Wasser ).

**1.7 Fmoc-GNQGSFLTKGPSKLDRAPGSG-1-Sp-35 Peptid (SEQ ID NO 11)**

- a) Die geschützte Peptidsäure Fmoc-GNQGSFLTKGPSKLDRAPGSG-OH wurde ausgehend von Fmoc-Gly-Sasrin-Harz hergestellt wie unter 1.a. beschrieben.
- b) Die Peptidsäure (31 mg, 0.08 mmol) wurde in Dimethylformamid (500 ml) aktiviert mit TBTU und innerhalb von 15 h an 1-Sp-35-Peptid-Harz (30 mg, 0.04 mmol) gekuppelt. Das Peptid wurde wie oben beschrieben vom Harz abgespalten und mit HPLC gereinigt. Ausbeute: 4.5 mg, 22.5% der Theorie.. Analyse: ES-MS-4979+2.2 ( berechnet 4980.75); RP HPLC Rt-18.5 min (Nucleosil C18; 4.6\*150 mm ; Gradient 10-70% B in A innerhalb von 30 min; B=0.1% Trifluoressigsäure in Acetonitril; A=0.1% Trifluoressigsäure in Wasser ).

**1.8 [H-Lys(Ac-GRGDSPGSG)]<sub>4</sub>-a,e-Lys<sub>2</sub>-a,e-Lys-Gly<sub>2</sub>-1-Sp-35 Peptid**

- a) 1-Sp-35-Peptid-Harz (353 mg, 0.047 mmol) wurde nacheinander acyliert mit jeweils 0.5 mmol Fmoc-Gly-OH (zwei Kupplungen), Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (zwei Kupplungen) und Boc-Lys(Fmoc)-OH mit Hilfe der TBTU/HOBT-Methode. Die Fmoc-Gruppe wurde zuerst abgespalten und dann das Peptid von einem Teil des Peptid-Harzes (35 mg, 0.00385 mmol). Nach Reinigung resultierte ein HPLC-reines Peptid. Ausbeute: 15 mg, 75% der Theorie.. Analyse: ES-MS-3711+1.4 ( berechnet 3711);RP HPLC Rt-10.5 min (Nucleosil C18; 4.6\*150 mm ; Gradient 10-70% B in A innerhalb von 30 min; B=0.1% Trifluoressigsäure

in Acet nitril; A=0.1% Trifluoressigsäure in Wasser).

- b) [Na-Boc-Lys]<sub>4</sub>-Lys<sub>2</sub>-Lys-Gly<sub>2</sub>-1-Sp-35 Peptid-Harz wurde mit Ac-GRGDSPGSG-OH (60.4 mg, 0.048 mmol) in Dimethylformamid (200 ml) mit Hilfe der TBTU/HOBТ-Methode innerhalb von 15 h acyliert. Nach Abspaltung des Peptids vom Harz und Entfernung der Schutzgruppen wurde nach Reinigung ein HPLC-reines Produkt erhalten. Ausbeute: 12.5 mg, 75% der Theorie.. Analyse: ES-MS-6962.5+2.1 (berechnet 6963); RP HPLC Rt- 11 min ( Nucleosil C 18; 4.6\*150 mm ; Gradient 10- 70% B in A innerhalb von 30 min; B=0.1% Trifluoressigsäure in Acetonitril; A=0.1% Trifluoressigsäure in Wasser ).

**1.9 Ac-GRGDSPGSG-GLFEAIAGFIENGWEGMIDG-1-Sp-35 Peptid  
(GLF.....= SEQ ID NO 12)**

- a) Es wurden zuerst die geschützten Peptidsäuren Fmoc-GLFEAIAG-OH (SEQ ID NO.13) und Fmoc-FIENGWEGMIDG-OH (SEQ ID NO.14) hergestellt. Diese entsprechen Teilen der Sequenz des "Fusions-peptides" des Influenza Virus Hämagglutinin. Die Peptidsäuren wurden analog zu den Methoden hergestellt, die für das Peptid GRGDSPGSG verwendet wurden.
- b) Fmoc-FIENGWEGMIDG-OH ( 25.5 mg, 0.012 mmol ) wurde mit TBTU/HOBТ in DMF ( 500 ml ) aktiviert und innerhalb von 15 h an das 1-Sp-35-Peptid-Harz ( 30 mg, 0.004 mmol ) gekuppelt. Nach Abspaltung der Fmoc- Gruppe von dem harzgebundenen Peptid wurde Fmoc-GLFEAIAG-OH (12.6 mg, 0.012 mmol) mit TBTU/HOBТ in DMF/NMP (1:1) (1ml) aktiviert und angekuppelt. Ein Teil des so erhaltenen Peptid-Harzes wurde zu einer Peptid- und Schutz-

gruppenabspaltung eingesetzt.

Analyse: ES-MS- 5175.2+0.8 (berechnet 5176.6 ); RP HPLC Rt-29.5 min ( Nucleosil C18; 4.6\*150 mm ; Gradient 10-70% B in A innerhalb von 30 min; B=0.1% Trifluoressigsäure in Acetonitril; A=0.1% Trifluoressigsäure in Wasser ).

- c) Nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe von der Hauptmenge des Peptidharzes (nach 9.b.) wurde mit Ac-GRGDSPGSG-OH (10.2 mg, 0.008 mmol) acyliert wie beschrieben. Nach Abspaltung und Reinigung konnte ein HPLC-reines Peptid erhalten werden.

Ausbeute: 4.2 mg.

Analyse: ES-MS- 5766.11+0.8 (berechnet 5767.39); RP HPLC Rt-24 min (Nucleosil C18; 4.6\*150 mm ; Gradient 10-70% B in A innerhalb von 30 min; B=0.1% Trifluoresigsäure in Acetonitril; A=0.1% Trifluoressigsäure in Wasser).

#### 1.10 Ac-GRGDSPGSG-Lys (Oestrogen)-1-Sp-35 Peptid

- a) Fmoc-Lys(Dde)-OH (Novabiochem) (29.8 mg, 0.056 mmol) wurde zusammen mit äquivalenten Mengen an TBTU (18 mg), HOBT (8.4 mg) und Diisopropylethylamin (19.2 mg, 0.11 mmol) in DMF (150 ml) gelöst. Nach 20 min wurde die Reaktionsmischung zu 1-Sp-35-Peptid-Harz (83 mg, 0.0112 mmol) gegeben. Nach 2 h wurde die Fmoc-Gruppe abgespalten und an das resultierende Peptid-Harz wurde das seitenkettengeschützte Ac-GRGDSPGSG (42mg, 0.0336 mmol) in DMF (200 ml) gekuppelt mit Hilfe von TBTU/HOBT. Die Dde-Gruppe wurde mit 2% Hydrazin in DMF innerhalb von 1 h entfernt.

b)  $\beta$ -Oestradiol-6-on-6-(O-carb xymethyloxim) (4.6 mg, 0.0121 mmol; Fluka) wurde mit äquivalenten Mengen an HOBT (1.8 mg), Diisopropylcarbodiimid (2 ml) in DMF (100 ml) an Ac-GRGDSPGSG-Lys-1-Sp-35-Peptid-Harz gekuppelt. Nach Abspaltung vom Harz und Entfernung der Schutzgruppen wurde nach Reinigung ein HPLC reines Steroid-Peptid erhalten. Ausbeute 6 mg.  
Analyse: ES-MS- 3984.2+0.7 (berechnet 3984); RP HPLC Rt-15.5 min (Nucleosil C18; 4.6\*150 mm ; Gradient 10-70% B in A innerhalb von 30 min; B=0.1% Trifluoressigsäure in Acetonitril; A=0.1% Trifluoressigsäure in Wasser).

#### 1.11 Ac-GRGDSPGSG-Lys(Ac-PKKRKVPGSG)-1-Sp-35 Peptid

Die freie Aminogruppe von Ac-GRGDSPGSG-Lys-1-Sp-35-Peptid-Harz (50 mg, hergestellt nach 10.a.) wurde acyliert mit 3 Äquivalenten Fmoc-PKKRKVPGSG-OH (42 mg) in DMF (150 ml) nach der Vorschrift in 6.6 und abgespalten.

Analyse: ES-MS- 4846.09+0.8 (berechnet 4849.2); RP HPLC Rt-11.6 min (Nucleosil C18; 4.6\*150 mm ; Gradient 10-70% B in A innerhalb von 30 min; B=0.1% Trifluoressigsäure in Acetonitril; A=0.1% Trifluoressigsäure in Wasser).

#### 1.12 [Lys(Asn-Lactose)]<sub>4</sub>-Lys<sub>2</sub>-Lys-Gly<sub>2</sub>-1-Sp-35 Peptid

a) D(+)Lactose Monohydrat (Fluka) (1.8 g, 5 mmol) wurden mit gesättigter Ammoniumcarbonatlösung (40 ml) auf 30°C 6 Tage erwärmt. Dann wurde mit Wasser (20 ml) verdünnt und die Lösung auf die Hälfte des Volumens eingeengt. Dieser Vorgang wurde jedesmal wiederholt um das überschüssige Ammoniumcarbonat zu entfernen. Schließlich wurde lyophilisiert und der resultierende

Aminozucker wurde ohne weitere Reinigung zur Synthese von Fmoc-Asn(Lactose)-OtBu eingesetzt. Dazu wurde Fmoc-Asp-OtBu (Bachem) (480 mg, 1.17 mmol) und HOBT (228 mg, 1.52 mmol) in DMF (5 ml) gelöst, dann wurde bei 4°C Diisopropylcarbodiimid (205 mg, 1.63 mmol) zugegeben. Nach 15 min Rühren bei 4°C und 20 min bei 25°C wurde 1-Aminolactose (5.85 mmol) in DMF/Wasser (2:1, v/v, 6 ml) zu der Lösung des Aktivesters gegeben. Nach 6 h Rühren wurde im Vakuum das Solvens entfernt und Ether zugegeben. Das Produkt wurde abfiltriert, mit kaltem Ether und kaltem Wasser gewaschen. Die tBu-Gruppe wurde mit TFA/Wasser (7:3, v/v) innerhalb von 20 min bei Raumtemperatur abgespalten. Nach Verdampfen der Lösungsmittel in Vakuum wurde in tert-Butylalkohol/Wasser (4:1, v/v) gelöst und lyophilisiert. Die Reinigung von Fmoc-Asn(lactose)-OH erfolgte über RP MPLC (LiChroprep C18, 25\*310 mm, Merck; isokratisch in 30% Acetonitril/Wasser/0.1% TFA). Ausbeute: 280 mg, 35% der Theorie bezogen auf Fmoc-Asp-OtBu.

Analyse: (+)FAB-MS: MH<sup>+</sup> 679 (berechnet 679), RP HPLC Rt=6.59 min (Nucleosil C18; 4.6\*150 mm ; Gradient 30-100% B in A innerhalb von 30 min; B=0.1% Trifluoresigsäure in Acetonitril; A=0.1% Trifluoressigsäure in Wasser).

- b) Fmoc-Asn(Lactose)-OH (32.5 mg, 0.048 mmol) und HOBT (7.25 mg, 0.05 mmol) wurden in DMF (200 ml) gelöst und Diisopropylcarbodiimide (6.31 mg, 0.05 mmol) zugegeben. Nach 30 min wurde die Aktivesterlösung zu Lys<sub>4</sub>-Lys<sub>2</sub>-Lys-Gly<sub>2</sub>-1-Sp-35-Peptid-Harz (30 mg, 0.0162 mmol) gegeben. Nach 15 h wurde das Peptid-Harz gewaschen, das N-lactosylierte Peptid abgespalten und

mit semipräparativer HPLC gereinigt. Ausbeute 10.6 mg.

Analyse: ES-MS- 5463.71+0.7 (berechnet 5463); RP HPLC Rt-11.6 min (Nucleosil C18; 4.6\*150 mm ; Gradient 10-70% B in A innerhalb von 30 min; B=0.1% Trifluoressigsäure in Acetonitril; A=0.1% Trifluoressigsäure in Wasser).

### Beispiel 2

#### Nachweis der Bindung an Nukleinsäuren

Die Analyse der Nukleinsäure-Bindung des Proteins (NC-Protein), von Fragmenten des NC-Proteins sowie der entsprechenden Peptidderivate erfolgte in Filterbindungs- tests (vgl. J. Mol. Biol. 34 (1968), 361 - 364, Nature 342 (1989), 816 - 819).

Es werden steigende Mengen Protein mit einer konstanten Menge radioaktiv markierter Nukleinsäure in 100 µl Bindungspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 100 µM ZnCl<sub>2</sub>) 15 min bei 25°C inkubiert und anschließend über Nitrozellulosefilter mit einer Porenweite von 0.45 µm filtriert. Die Nitrozellulosefilter werden anschließend zweimal mit je 1 ml Bindungspuffer gewaschen und die gebundene Radioaktivität durch Szintillationszählung bestimmt.

Als Test-Nukleinsäuren dient HIV-1 RNA (vgl. J. Mol. Biol. 229 (1993), 94 - 104), die während der in vitro Transkription durch Inkorporation von α-[<sup>32</sup>P]-UTP radioaktiv markiert wird. Außerdem werden 5'-<sup>32</sup>P endmarkierte Oligodesoxynukleotide verwendet.

Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten erfolgt durch Analyse der Bindungsdaten in doppelt reziproken Plots (vgl. J. Mol. Biol. 34 (1968), 361 - 364) durch Auftrag der reziproken relativen Sättigung (Ordinate) und der reziproken Proteinkonzentration (Abszisse).

In einem typischen Experiment wird RNA mit einer Konzentration von  $1.4 \times 10^{-11}$  M, einzelsträngiges Desoxynukleotid mit einer Konzentration von  $1.7 \times 10^{-10}$  M und doppelsträngiges Desoxynukleotid mit einer Konzentration von  $0.85 \times 10^{-10}$  M eingesetzt. In kompetitiven Filterbindungsstests werden die radioaktiv markierte Nukleinsäure und steigende Mengen unmarkierter Kompetitor-Nukleinsäure mit einer konstanten Protein-Konzentration inkubiert, wobei die Proteinzugabe zuletzt erfolgt.

Als zu bindende Nukleinsäuren wurden verwendet:

ms2-RNA (30facher Überschuss), ssM13-DNA (70fach), dsM13-Rf-DNA (265fach).

#### Beispiel 3

#### Nachweis der Bindung von Komplexen an Zellen und deren Integration in Zellen

Als nukleinsäurebindender Anteil des erfindungsgemäßen Peptids wird eine Teilsequenz des NCp7-Proteins (T.L. South, Biochemistry 30 (1991) 6342 - 6349) verwendet.

Dieses Peptid wird durch 22 Aminosäuren des viralen Proteins vp1 (F136), welches mit dem Integrinrezeptor interagiert, verlängert (Hynes, R.O. Cell 69 (1992) 11 - 25).

Zur Überprüfung der Integration von DNA mit Hilfe des erfindungsgemäßen Peptids wird ein Komplex hergestellt zwischen dem erfindungsgemäßen Peptid und einem 18mer-DNA Oligonukleotid, welches gegen den Start des zweiten Codons des humanen c-myb-RNA gerichtet ist. Die Sequenz dieses Antisenseoligonukleotides (a-myb) ist:

5'GTGCCGGGGTCTTCGGGC-3' (SEQ ID NO.15)

Es ist bekannt, daß dieses Oligonukleotid die Proliferation der humanen promyelocytischen Zelllinie HL60 reduziert (G. Anfossi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 3379 - 3383.

Durchführung des Tests:

Pro Test werden  $1 \times 10^4$  HL-60-Zellen (ATCC CCL 240) in einem Volumen von 0.5 ml RPMI-Medium (mit 10 % FKS) mit Peptidderivaten, komplexiert mit Oligodesoxynukleotid, versetzt. Dieser Ansatz wird für 5 Tage bei 37°C/5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Zur Auswertung wird die Zellzahl nach drei und fünf Tagen bestimmt. Hierzu werden 100 µl Zellen entnommen und das entsprechende Volumen mit RPMI-Medium (10 % FKS) aufgefüllt. Die Komplexierung von Peptid und Nukleinsäure erfolgt in einem Volumen von 10 µl Bindungspuffer. Nach 15 min bei Raumtemperatur wird die Mischung zu den Zellen gegeben. Am zweiten und am dritten Tag wird diese Behandlung mit einem Viertel der Ausgangsdosis wiederholt.

Beispiel 4

Test zur Bestimmung des Transports von Plasmid-DNA in eukaryotischen Zellen in Anwesenheit von Derivaten des NC-Proteins

Zur Analyse des Transports von Plasmid DNA in eukaryotische Zellen werden Peptide und DNA komplexiert wie in Beispiel 2 beschrieben. Die Plasmide enthalten Indikator-Gene (Luziferase,  $\beta$ -Galaktosidase, Chloramphenikol-Transferase) unter Kontrolle viralen Promotoren (z. B. SV40 early promotor oder IE Promotor/Enhancer von MCMV. Es können auch gewebespezifische zelluläre Promotoren eingesetzt werden). 48 h nach Zugabe der komplexierten DNA zu den eukaryotischen Zellen wird die enzymatische Aktivität der exprimierten Indikator-Genprodukte analysiert. Die Analyse kann luminometrisch, photometrisch oder durch Acetylierung von Chloramphenicol mit  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-CoA erfolgen.

#### Beispiel 5

Test zur Bestimmung des Transports von RNA in eukaryotische Zellen in Anwesenheit von Derivaten des NC-Proteins

Der Test erfolgt wie in Beispiel 3 beschrieben. Hier werden in vitro transkribierte RNAs von Indikator-Genen verwendet. Analysiert wird ebenfalls die enzymatische Aktivität der exprimierten Genprodukte.

#### Beispiel 6

Hemmung der Proliferation von Capan-1 Zellen durch Ki-Ras Ribozym-DOTAP Komplexe

Capan-1 Zellen (ATCC HTB 79, humane Adenocarcinom-Zelllinie des Pancreas) wurden in Gewebekulturschalen mit 96 Vertiefungen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Dabei wurden in jede Vertiefung 5 x 10<sup>3</sup> Capan-1 Zellen in 100 µl RPMI Medium, das 10 % foetales Kälberserum (FKS) enthielt,

gegeben. Die Zellen wurden 12 h im Brutschrank kultiviert und daraufhin wie folgt behandelt: (control) 10  $\mu$ l TN-Puffer (50 mM Tris HCl pH 8.0, 50 mM NaCl; (DOTAP) 1  $\mu$ g DOTAP (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy) propyl]-N, N-trimethylammoniummethysulfat, Boehringer Mannheim) in 10  $\mu$ l TN; (DOTAP + Rz mut) 1  $\mu$ g DOTAP + 7.5 pmol mutiertes (mut) Rz (siehe Übersicht 1) in 10  $\mu$ l TN; (DOTAP + Rz wt) 1  $\mu$ g DOTAP + 7.5 pmol Rz wt in 10  $\mu$ l TN.

Die Komplexierungsreaktion erfolgte für 20 min bei Raumtemperatur. Nach 2 Tagen im Brutschrank wurden die Zellen einem MTT (3-[4,5 Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Test unterzogen. Hierzu wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums für 3 h mit 200  $\mu$ l RPMI, 10 % FKS, 1 mg/ml MTT im Brutschrank inkubiert. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen dann in 400  $\mu$ l Dimethylsulfoxid (DMSO) lysiert und der MTT Umsatz photometrisch bei 507 nm als optische Dichte (OD) bestimmt. Alle Bestimmungen erfolgten als Triplikate.

#### Beispiel 7

#### Hemmung der Proliferation von Capan-1 Zellen durch Ki-Ras Ribozym-Transferpeptidkomplexe

Es wurde exakt wie in Beispiel 6 verfahren. Hier wurden die Zellen wie folgt behandelt:

(control) 10  $\mu$ l TN; (Rz mut) 7.5 pmol Rz mut in 10  $\mu$ l TN; (Rz wt) 7.5 pmol Rz wt in 10  $\mu$ l TN; (Int) 150 pmol AcRGD-1-35 in 10  $\mu$ l TN; (Int + Rz mut) 7.5 pmol Rz mut + 150 pmol AcRGD-1-35 in 10  $\mu$ l TN; (Int + Rz wt) 7.5 pmol Rz wt + 150 pmol AcRGD-1-35 in 10  $\mu$ l TN.

Die Ergebnisse zeigt Tabelle 1:

	Proliferationshemmung [OD 507 nm]
DOTAP	0,72
DOTAP + Rz wt	0,63
DOTAP + Rz mut	0,70
Rz mut	0,76
Rz wt	0,72
Int + Rz wt	0,49
Int + Rz mut	0,63

Rz wt: Ribozym 2'-O-alkylmodifiziert wie in  
G. Paoella, EMBO J. 11 (1992) 1913 - 1919  
beschrieben (SEQ ID NO: 16)

Rz mut: Mutante von Rz wt, in der die Nukleotide  
11 - 13 deletiert sind.

Int: AcRGD1-35 entspricht SEQ ID NO: 19, Tabelle 3

#### Beispiel 8

Vergleich der Transfereffizienz von DOTAP und Transferpeptid bei HL60 Zellen, Kompetition des Transfers

Die Durchführung der Tests erfolgte unter Standardbedingungen (Beispiel 3). (a-myb + Int) 0,43 µM AcRGD-1-35 + 1 µg/ml myb - antisense; (DOTAP + a-myb) 10 µg/ml DOTAP + 1 µg/ml myb -antisense; (Int-Komp) 0,43 µM AcRGD-1-35 + 0,43

$\mu$ m F136-1-35 (FMDV Integrin Bindestelle) + 1  $\mu$ g/ml myb-antisense; (5  $\mu$ g DOTAP) 10  $\mu$ g/ml DOTAP; (a-myb) 1  $\mu$ g/ml DOTAP.

Die Ergebnisse zeigt Tabelle 2:

Zellzahl nach 5 Tagen

---

Int + a-myb	15
DOTAP + a-myb	44
Int + Komp	50
Dotap	58
a-myb	72

Int: Ac RGD-1-35 (SEQ ID NO: 19)

a-myb: SEQ ID NO: 15

Komp: F 136 (die ersten N-terminalen 22 AS von  
SEQ ID NO: 17), Tabelle 3

Tabelle 3

## Dissoziationskonstanten

Tabell 4

Bindepartner	Herkunft	Amino-säuren-bereich	Ligand
Nucleoplasmin	X	155	RKpaatKKaggqaKKKK1
NO38	X	142	KRiapdsaskvpRKKtR
N1/N2	X	534	KRKteesplKdKdaKK
Glucocorticoid	M, R	-	RKclqagmnleaRKtKK
Glucocorticoid $\alpha$	H	479	RKclqagmnleaRKtKK
Glucocorticoid $\beta$	H	479	RKclqagmnleaRKtKK
Progesterone	C, H, Ra	-	RKccqagmvlggRKfKK
Androgen	H	432	RKcyeagmtlgaRK1KK
Estrogen	C, H, R	-	RKcyevgmmkkggiRKdR
	C	250	RKdRRggemmKqKRqRe
	H, R	-	RKdRRggRmlKhKRqRd
erb-A	C	128	KRvaKRKlieenReRRR
erb-A	H	179	KRlaKRKlieenReKRR
Thyroid $\alpha$ -1	R	130	KRvaKRKlieqnReRRR
Thyroid $\alpha$ -2	H, R	-	KRvaKRKlieqnReRRR
Thyroid $\beta$	H	179	KRlaKRKlieenReKRR
p53	H	305	KRalpnntssspapKKK
	M	302	KRalptctsasppqKKK
		316	KKKpldgeyftlKiRgR
	C	253	RRcfevRvcacpgRdRK
		286	KRamsppteapeppKKR
	R	303	KRalptstssspqqKKK
		317	KKKpldgeyftlKiRgR
	X	242	RRcfevRvcacpgRdRR

X: Xenopus

R: Ratte

H: human

M: Maus

C: Huhn

Tabelle 5

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALGEMEINE INFORMATION:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH
- (B) STRASSE: Sandhofer Str. 116
- (C) ORT: Mannheim
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: D-68305
- (G) TELEPHON: 08856/223446
- (H) TELEFAX: 08856/223451

(ii) ANMELDETITEL: Nukleinsaeure-transferpeptide und deren Verwendung zur Einschleusung von Nukleinsaeuren in eukaryontische Zellen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 30

## (iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

## (vi) FRÜHERE ANMELDEDATEN:

- (A) ANMELDENUMMER: DE P 43 12 131.4
- (B) ANMELDEDATUM: 14-APR-1993

## (vi) FRÜHERE ANMELDEDATEN:

- (A) ANMELDENUMMER: DE P 43 18 470.7
- (B) ANMELDEDATUM: 03-JUN-1993

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val  
1 5

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 17 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Lys Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys  
1 5 10 15

Leu

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 7 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Val Ser Lys Arg Pro Arg Pro  
1 5

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 7 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Ser Thr Pro Lys Arg Lys Arg  
1 5

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 11 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Thr Pro Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro Lys Lys  
1 5 10

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 8 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro Lys  
1 5

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 5 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Pro Arg Gly Arg Pro  
1 5

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 24 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Gly Pro Tyr Glu Gly Pro Val Lys Lys Pro Val Ala Leu Lys Val Lys  
1 5 10 15  
Ala Lys Asn Leu Ile Val Thr Glu  
20

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Gly Arg Gly Asp Ser Pro Gly Ser Gly  
1 5

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 10:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 11 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Pro Gly Ser Gly  
1 5 10

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 11:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 21 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys Leu Asp Arg  
1 5 10 15

Ala Pro Gly Ser Gly  
20

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 12:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 20 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Gly Leu Phe Glu Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly  
1 5 10 15

Met Ile Asp Gly  
20

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 13:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 8 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

Gly Leu Phe Glu Ala Ile Ala Gly  
1 5

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 14:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 12 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Phe	Ile	Glu	Asn	Gly	Trp	Glu	Gly	Met	Ile	Asp	Gly
1					5					10	

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 15:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 18 Basenpaare  
 (B) ART: Nukleinsäure  
 (C) STRANGFORM: Einzel  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(iii) ANTISENSE: JA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

GTGCCGGGGT CTTCGGGC

18

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 16:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 36 Basenpaare  
 (B) ART: Nukleinsäure  
 (C) STRANGFORM: Einzel  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: RNS (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

CUACGCCUG AUGAGUCCGU GAGGACGAAA CAGCUC

36

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 17:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 77 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

Tyr	Asn	Arg	Asn	Ala	Val	Pro	Asn	Leu	Arg	Gly	Asp	Leu	Gln	Val	Leu
1									10						15
Ala	Gln	Lys	Val	Ala	Gly	Met	Gln	Arg	Gly	Asn	Phe	Arg	Asn	Gln	Arg
						20		25						30	
Lys	Met	Val	Lys	Cys	Phe	Asn	Cys	Gly	Lys	Glu	Gly	His	Thr	Ala	Arg
						35		40					45		
Asn	Cys	Arg	Ala	Pro	Arg	Lys	Lys	Gly	Cys	Trp	Lys	Cys	Gly	Lys	Glu
						50		55			60				
Gly	His	Gln	Met	Lys	Asp	Cys	Thr	Glu	Arg	Gln	Ala	Asn			
						65		70			75				

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 18:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 57 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

Tyr	Asn	Arg	Asn	Ala	Val	Pro	Asn	Leu	Arg	Gly	Asp	Leu	Gln	Val	Leu
1									10						15
Ala	Gln	Lys	Val	Ala	Gly	Met	Gln	Arg	Gly	Asn	Phe	Arg	Asn	Gln	Arg
						20		25						30	
Lys	Met	Val	Lys	Cys	Phe	Asn	Cys	Gly	Lys	Glu	Gly	His	Thr	Ala	Arg
						35		40					45		
Asn	Cys	Arg	Ala	Pro	Arg	Lys	Lys	Gly							
						50		55							

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 19:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 44 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

Gly Arg Gly Asp Ser Pro Gly Ser Gly Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg  
1 5 10 15  
Asn Gln Arg Lys Met Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His  
20 25 30  
Thr Ala Arg Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly  
35 40

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 20:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 45 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

Tyr Asn Arg Asn Ala Val Pro Asn Leu Arg Gly Asp Leu Gln Val Leu  
1 5 10 15  
Ala Gln Lys Val Ala Gly Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg Asn Gln Arg  
20 25 30  
Lys Met Val Lys Gly Gly Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly  
35 40 45

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 21:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 32 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

Gly	Arg	Gly	Asp	Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Met	Gln	Arg	Gly	Asn	Phe	Arg
1															15
Asn	Gln	Arg	Lys	Met	Val	Lys	Gly	Gly	Arg	Ala	Pro	Arg	Lys	Lys	Gly
				20									25		30

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 22:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 37 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Peptide  
 (B) LAGE: 11  
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "Seitenketten an den AS 11 + 12 (Lysin) gem. Tabelle 3"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Peptide  
 (B) LAGE: 12  
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "Seitenketten an den AS 11 + 12 (Lysin) gem. Tabelle 3"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

Gly	Arg	Gly	Asp	Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Lys	Lys	Lys	Gly	Gly	Met	Gln
1															15
Arg	Gly	Asn	Phe	Arg	Asn	Gln	Arg	Lys	Met	Val	Lys	Gly	Gly	Arg	Ala
				20									25		30
Pro	Arg	Lys	Lys	Gly											
				35											

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 23:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 44 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys Leu Asp Arg  
1 5 10 15  
Ala Pro Gly Ser Gly Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg Asn Gln Arg Lys  
20 25 30  
Met Val Lys Gly Gly Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly  
35 40

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 24:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 33 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

Gly Arg Gly Asp Ser Pro Gly Ser Gly Gly Pro Tyr Glu Gly Pro Val  
1 5 10 15  
Lys Lys Pro Val Ala Leu Lys Val Lys Ala Lys Asn Leu Ile Val Thr  
20 25 30  
Glu

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 25:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 43 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

Gly	Leu	Phe	Glu	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe	Ile	Glu	Asn	Gly	Trp	Glu	Gly
1				5					10				15		
Met	Ile	Asp	Gly	Met	Gln	Arg	Gly	Asn	Phe	Arg	Asn	Gln	Arg	Lys	Met
		20						25					30		
Val	Lys	Gly	Gly	Arg	Ala	Pro	Arg	Lys	Lys	Gly					
		35						40							

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 26:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 52 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

Gly	Arg	Gly	Asp	Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Gly	Leu	Phe	Glu	Ala	Ile	Ala
1				5					10				15		
Gly	Phe	Ile	Glu	Asn	Gly	Trp	Glu	Gly	Met	Ile	Asp	Gly	Met	Gln	Arg
	20							25					30		
Gly	Asn	Phe	Arg	Asn	Gln	Arg	Lys	Met	Val	Lys	Gly	Arg	Ala	Pro	
	35						40					45			
Arg	Lys	Lys	Gly												
	50														

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 27:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 43 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

Gly	Arg	Gly	Asp	Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Pro	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	Val
1										10				15	
Pro	Gly	Ser	Gly	Met	Gln	Arg	Gly	Asn	Phe	Arg	Asn	Gln	Arg	Lys	Met
				20					25				30		
Val	Lys	Gly	Gly	Arg	Ala	Pro	Arg	Lys	Lys	Gly					
								35	40						

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 28:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 35 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

- (ix) MERKMALE:  
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: Peptide  
 (B) LAGE: 12  
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "Seitenkette an der AS 12  
 (Lysin) gem. Tabelle 5"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:

Pro	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	Val	Pro	Gly	Ser	Gly	Lys	Met	Gln	Arg	Gly
1											10			15	
Asn	Phe	Arg	Asn	Gln	Arg	Lys	Met	Val	Lys	Gly	Gly	Arg	Ala	Pro	Arg
					20				25				30		
Lys	Lys	Gly													
		35													

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 29:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 28 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Peptide  
 (B) LAGE: 2  
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "Seitenketten an den AS 2 +  
 3 (Lysin) und Galactose-Derivatisierung gem.  
 Tabelle 5"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Peptide  
 (B) LAGE: 3  
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "Seitenketten an den AS 2 +  
 3 (Lysin) und Galactose-Derivatisierung gem.  
 Tabelle 5"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:

Lys	Lys	Lys	Gly	Gly	Met	Gln	Arg	Gly	Asn	Phe	Arg	Asn	Gln	Arg	Lys
1					5						10			15	
Met	Val	Lys	Gly	Gly	Arg	Ala	Pro	Arg	Lys	Lys	Gly				
					20					25					

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 30:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 27 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 30:

Lys	Gly	Ser	Gly	Met	Gln	Arg	Gly	Asn	Phe	Arg	Asn	Gln	Arg	Lys	Met
1					5						10			15	
Val	Lys	Gly	Gly	Arg	Ala	Pro	Arg	Lys	Lys	Gly					
					20				25						

**P a t e n t a n s p r ü c h e****1. Nukleinsäure-transferpeptid enthaltend :**

- a) einen ersten Liganden, ausgewählt aus der Gruppe Peptid, Steroid, Kohlenhydrat, Lipid oder Vitamin, welches an einen Bindepartner an der Zelloberfläche von eukaryontischen Zellen bindet und dabei eine Endozytose des Komplexes aus dem genannten Nukleinsäure-transferpeptid und einer Nukleinsäure auslöst,
  - b) einen zweiten Liganden, ausgewählt aus der Gruppe Peptid, Steroid, Kohlenhydrat, Lipid oder Vitamin, welches an einen Bindepartner auf der äußeren Kernmembran von eukaryontischen Zellen bindet,
  - c) einen dritten Liganden, welcher ein basisches Peptid ist und durch ionische Wechselwirkung an Nukleinsäuren bindet.
2. Nukleinsäure-transferpeptid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der erste Ligand als Peptid eine Länge von 2 - 100 Aminosäuren, der zweite Ligand als Peptid eine Länge von 2 - 20 Aminosäuren und der dritte Ligand als Peptid eine Länge von 3 - 100 Aminosäuren besitzt.

3. Nukleinsäure-transferpeptid nach den Ansprüchen 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es als
  - a) Steroid: Progesteron, Androgen, Östrogen
  - b) als Kohlenhydrat: Galactose, Mannose-6-Phosphat, Lewis-X-Kohlenhydrate
  - c) als Lipid: Fettsäuren, Arachidonsäure
  - d) als Vitamin: Vitamin A oder D3enthält.
4. Nukleinsäure-transferpeptid nach den Ansprüchen 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß es zusätzlich einen vierten Liganden, ausgewählt aus der Gruppe Peptid oder Lipid enthält, welcher die Auflösung der bei der Endozytose entstandenen Endosomen beschleunigt.
5. Nukleinsäure-transferpeptid nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der vierte Ligand als Peptid eine Länge von 10 - 40 Aminosäuren hat.
6. Nukleinsäure-transferpeptid nach den Ansprüchen 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, daß der erste Ligand ein peptidisches Ligand für den Integrinrezeptor oder eine gp120-Bindungsstelle ist.
7. Nukleinsäure-transferpeptid nach den Ansprüchen 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, daß der erste Ligand ein peptidisches Ligand für den Östrogen-Rezeptor ist.

8. Nukleinsäure-transferpeptid nach den Ansprüchen 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, daß der erste Ligand ein peptidisches Ligand für den Galactose-Rezeptor ist.
9. Nukleinsäure-transferpeptid nach den Ansprüchen 1 - 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Gesamtlänge des Nukleinsäure-transferpeptids 10 - 250 Aminosäuren beträgt.
10. Komplex enthaltend, über ionische Wechselwirkung gebunden, eine Nukleinsäure und mindestens ein Nukleinsäure-transferpeptid gem. den Ansprüchen 1 - 9.
11. Komplex nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine DNA oder RNA ist.
12. Komplex nach den Ansprüchen 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure ein Ribozym oder eine Antisensenukleinsäure ist.
13. Komplex nach den Ansprüchen 10 - 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure ein eine exogene Nukleinsäure tragender Vektor ist.
14. Komplex nach den Ansprüchen 10 - 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure mindestens ein funktionsell aktives, in eukaryontischen Zellen exprimierbares Gen enthält.
15. Komplex nach den Ansprüchen 10 - 14, dadurch gekennzeichnet, daß an die Nukleinsäure ionisch gebunden ein Peptid gemäß den Ansprüchen 1 - 9 und zusätzlich, ebenfalls ionisch gebunden, ein basisches Peptid, welches durch ionische Wechselwirkung an Nukleinsäure

bindet und kovalent mit einem Peptid oder Lipid verbunden ist, welche die Auflösung der Endosomen, welche bei der durch das genannte Nukleinsäure-transferpeptid verursachten Endozytose entstanden sind, beschleunigt.

16. Verfahren zur Herstellung von Nukleinsäure-transferpeptiden nach den Ansprüchen 1 - 9, dadurch gekennzeichnet, daß die das C-terminale Ende bildende Aminosäure an einen Träger gebunden wird, vom C-terminalen Ende des Nukleinsäure-transferpeptid schrittweise aufgebaut, vom Träger abgespalten und gegebenenfalls mit Kohlenhydraten, Lipiden, Vitaminen oder Steroiden kovalent gekoppelt wird.
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleinsäure-transferpeptid in Fragmenten synthetisiert und die Fragmente durch Peptidbindungen ligiert werden.
18. Verfahren zur Transfektion von eukaryontischen Zellen mit Nukleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß ein Komplex nach den Ansprüchen 10 - 15 und 22 mit eukaryontischen Zellen in Kontakt gebracht und inkubiert wird.
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß Hilfsmittel zur Zellfusion zugegeben werden.
20. Verwendung eines Komplexes nach den Ansprüchen 10 - 15 und 22 zur Herstellung eines Therapeutikums zur Behandlung von viralen Infektionen, zur Gentherapie, zur Stimulierung der Immunreaktion gegen maligne

Zellen bzw. Tumoren, zur Expression von Faktoren, zur Stimulierung der Immunreaktion gegen maligne Zellen bzw. Tumoren, zur Expression von Faktoren, zur Zellmarkierung und zur Zell-Integration von Genen, welche für Proteine codieren, die in die Zelloberfläche integriert werden.

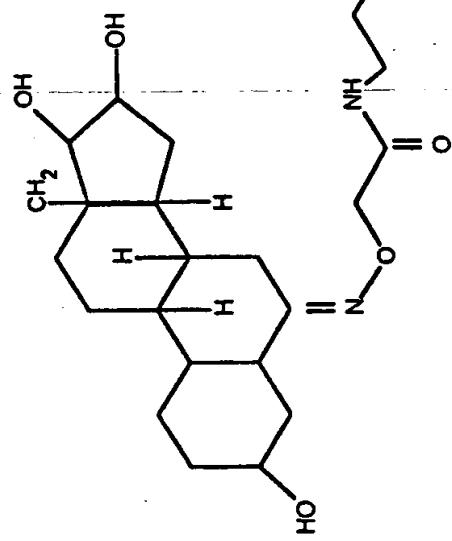
21. Verfahren zur Herstellung von Nukleinsäure-transferpeptiden gemäß den Ansprüchen 1 - 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Peptidanteil durch Genexpression rekombinant hergestellt wird und anschließend ggf. mit Kohlehydraten, Lipiden, Vitaminen oder Steroiden kovalent gekoppelt wird.
22. Komplex nach den Ansprüchen 10 - 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindung von mindestens zwei Liganden untereinander über die Nukleinsäure als bi- oder multifunktioneller Bindepartner erfolgt.
23. Komplex nach den Ansprüchen 10 - 15, dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleinsäuretransferpeptid keinen zweiten, kernbindenden Liganden enthält und als Nukleinsäure ein Ribozym oder eine Antisensesequenz bis etwa 30 Nukleotide Länge enthält.
24. Verwendung eines Komplexes nach Anspruch 23 zur Herstellung eines Therapeutikums zur Behandlung von viralen Infektionen, zur Gentherapie, zur Stimulierung der Immunreaktion gegen maligne Zellen bzw. Tumoren, zur Expression von Faktoren, zur Stimulierung der Immunreaktion gegen maligne Zellen bzw. Tumoren, zur Expression von Faktoren, zur Zellmarkierung und

**zur Zell-Integration von Genen, welche für Proteine codieren, die in die Zelloberfläche integriert werden.**

Fig. 1

K-GSG-MQRGNFRNQRKMVK-GG-RAPRKKG

Oestrogen-1-Sp-35



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No  
PCT/EP 94/01147

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 5 A61K47/48 C12N15/78

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 5 A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP,A,0 535 576 (BOEHRINGER INGELHEIM INT.) 15 April 1993 cited in the application see the whole document & WO,A,93 07282 ---	1-24
A	EP,A,0 388 758 (BOEHRINGER INGELHEIM INT.) 26 September 1990 cited in the application see the whole document ---	1-24
Y	WO,A,91 14696 (GILEAD SCIENCES INC.) 3 October 1991 see page 11, line 2 - line 9 see page 11, line 23 - line 28 see page 22, line 18 - line 34 see page 24, line 28 - line 35; claims ---	1-24

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  15 July 1994	Date of mailing of the international search report  16.08.94
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Berte, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No  
PCT/EP 94/01147

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO,A,93 04701 (UNIVERSITY OF CONNECTICUT) 18 March 1993 see page 5, line 17 - page 6, line 30 see page 7, line 16 - line 32; claims ---	1-24
Y	WO,A,89 10348 (SYNPHARM LTD) 2 November 1989 see page 2; figure 1 see page 4, line 1 - line 11 see page 10, line 7 - line 18; claims 1,10,17 see page 6, paragraph 5 ---	1-24
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol.21, no.4, 1993, ARLINGTON, VIRGINIA US pages 871 - 878 P. MIDOUX ET AL. 'SPECIFIC GENE TRANSFER MEDIATED BY LACTOSYLATED POLY-L-LYSINE INTO HEPATOMA CELLS.' cited in the application see page 871, column 2, paragraph 1 ---	1-24
Y	BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol.3, no.6, 1992, WASHINGTON US pages 533 - 539 C. PLANK ET AL. 'GENE TRANSFER INTO HEPATOCYTES USING ASIALOGLYCOPROTEIN RECEPTOR MEDIATED ENDOCYTOSIS OF DNA COMPLEXED WITH AN ARTIFICIAL TETRA-ANTENNARY GALACTOSE LIGAND' see page 538; figure 4 ---	1-24
Y	EP,A,0 359 347 (NEORX CORPORATION) 21 March 1990 see page 3, line 30 - line 35 see page 7, line 25 - line 34 see page 16, line 12 - line 14; claims 1,9,10,12,14,15 ---	1-24
Y,X	WO,A,91 17173 (CYTOGEN CORPORATION) 14 November 1991 see page 27 - page 33 see page 34, line 26 - page 35, line 1 see claims; tables I,II ---	1-24
P,X	WO,A,94 04696 (MILES INC.) 3 March 1994 see figures 4,5 -----	1-24

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/EP 94/01147

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: 1-24 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
please see annexe .../...
  
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.



No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/EP 94/01147

Due to the large number of compounds defined in theory by the general definition given in claim 1 the search had to be restricted for reasons of economy. The search was limited to the substances supported by the pharmacological data and/or to the specific compounds claimed and to the basic idea underlying the present application (see Guidelines, Part B, Chapter III, Paragraph 3.6).

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l Application No  
PCT/EP 94/01147

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0535576	07-04-93	AU-A-	2593292	03-05-93
		CA-A-	2114800	15-04-93
		WO-A-	9307282	15-04-93
		FI-A-	941473	30-03-94
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9307282	15-04-93	AU-A-	2593292	03-05-93
		CA-A-	2114800	15-04-93
		EP-A-	0535576	07-04-93
		FI-A-	941473	30-03-94
-----	-----	-----	-----	-----
EP-A-0388758	26-09-90	AU-B-	637085	20-05-93
		AU-A-	5137290	20-09-90
		CA-A-	2012311	16-09-90
		JP-A-	3200800	02-09-91
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9114696	03-10-91	AU-A-	7759291	21-10-91
		CA-A-	2079109	30-09-91
		EP-A-	0537299	21-04-93
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9304701	18-03-93	AU-A-	2678092	05-04-93
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-8910348	02-11-89	GB-A-	2217319	25-10-89
		AU-A-	3446189	24-11-89
		EP-A-	0413709	27-02-91
		JP-T-	4506203	29-10-92
-----	-----	-----	-----	-----
EP-A-0359347	21-03-90	US-A-	5135736	04-08-92
		JP-A-	2124833	14-05-90
		US-A-	5169933	08-12-92
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9117173	14-11-91	US-A-	5196510	23-03-93
		EP-A-	0527954	24-02-93
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9404696	03-03-94	AU-B-	5088593	15-03-94
-----	-----	-----	-----	-----

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen  
PCT/EP 94/01147

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 5 A61K47/48 C12N15/78

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestpräzisierung (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)

IPK 5 A61K C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestpräzisierung gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP,A,0 535 576 (BOEHRINGER INGELHEIM INT.) 15. April 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument & WO,A,93 07282 ---	1-24
A	EP,A,0 388 758 (BOEHRINGER INGELHEIM INT.) 26. September 1990 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-24
Y	WO,A,91 14696 (GILEAD SCIENCES INC.) 3. Oktober 1991 siehe Seite 11, Zeile 2 - Zeile 9 siehe Seite 11, Zeile 23 - Zeile 28 siehe Seite 22, Zeile 18 - Zeile 34 siehe Seite 24, Zeile 28 - Zeile 35; Ansprüche ---	1-24

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- \*'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- \*'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- \*'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfahrung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfunderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- \*'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfahrung kann nicht als auf erfunderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- \*'Z' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche  15. Juli 1994	Absendedatum des internationalen Rechercheberichts  16. 08. 94
Name und Postanschrift der Internationale Recherchebehörde  Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Berte, M

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Aktenzeichen  
PCT/EP 94/01147

## C.(Fortssetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO,A,93 04701 (UNIVERSITY OF CONNECTICUT) 18. März 1993 siehe Seite 5, Zeile 17 - Seite 6, Zeile 30 siehe Seite 7, Zeile 16 - Zeile 32; Ansprüche ---	1-24
Y	WO,A,89 10348 (SYNPHARM LTD) 2. November 1989 siehe Seite 2; Abbildung 1 siehe Seite 4, Zeile 1 - Zeile 11 siehe Seite 10, Zeile 7 - Zeile 18; Ansprüche 1,10,17 siehe Seite 6, Absatz 5 ---	1-24
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd.21, Nr.4, 1993, ARLINGTON, VIRGINIA US Seiten 871 - 878 P. MIDOUX ET AL. 'SPECIFIC GENE TRANSFER MEDIATED BY LACTOSYLATED POLY-L-LYSINE INTO HEPATOMA CELLS.' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 871, Spalte 2, Absatz 1 ---	1-24
Y	BIOCONJUGATE CHEMISTRY, Bd.3, Nr.6, 1992, WASHINGTON US Seiten 533 - 539 C. PLANK ET AL. 'GENE TRANSFER INTO HEPATOCYTES USING ASIALOGLYCOPEPTIDE RECEPTOR MEDIATED ENDOCYTOSIS OF DNA COMPLEXED WITH AN ARTIFICIAL TETRA-ANTENNARY GALACTOSE LIGAND' siehe Seite 538; Abbildung 4 ---	1-24
Y	EP,A,0 359 347 (NEORX CORPORATION) 21. März 1990 siehe Seite 3, Zeile 30 - Zeile 35 siehe Seite 7, Zeile 25 - Zeile 34 siehe Seite 16, Zeile 12 - Zeile 14; Ansprüche 1,9,10,12,14,15 ---	1-24
Y,X	WO,A,91 17173 (CYTOGEN CORPORATION) 14. November 1991 siehe Seite 27 - Seite 33 siehe Seite 34, Zeile 26 - Seite 35, Zeile 1 siehe Ansprüche; Tabellen I,II ---	1-24
P,X	WO,A,94 04696 (MILES INC.) 3. März 1994 siehe Abbildungen 4,5 -----	1-24

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 94/01147

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_ weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2.  Ansprüche Nr. 1-24 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
bitte siehe Anlage .../..
3.  Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_ weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
 Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
<p>Sinnvolle Ermittlungen nicht moeglich oder .... 2. Unklarheiten,etc.....</p> <p>Wegen der grossen Zahl der Verbindungen, die die allgemeine Definition von Anspruch 1 theoretisch definiert, musste die Recherche aus oekonomischen Gruenden eingeschraenkt werden. Die Recherche beschraenkte sich auf die durch pharmakologische Daten gestuetzte Substanzen und/oder auf die spezifisch beanspruchten Verbindungen sowie auf den unterliegenden Gedanken der vorliegenden Anmeldung (siehe Richtlinien, Teil B, Kapitel III, Paragraph 3.6).</p>	

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Int.	nationales Aktenzeichen
PCT/EP 94/01147	

im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP-A-0535576	07-04-93	AU-A-	2593292	03-05-93
		CA-A-	2114800	15-04-93
		WO-A-	9307282	15-04-93
		FI-A-	941473	30-03-94
-----				
WO-A-9307282	15-04-93	AU-A-	2593292	03-05-93
		CA-A-	2114800	15-04-93
		EP-A-	0535576	07-04-93
		FI-A-	941473	30-03-94
-----				
EP-A-0388758	26-09-90	AU-B-	637085	20-05-93
		AU-A-	5137290	20-09-90
		CA-A-	2012311	16-09-90
		JP-A-	3200800	02-09-91
-----				
WO-A-9114696	03-10-91	AU-A-	7759291	21-10-91
		CA-A-	2079109	30-09-91
		EP-A-	0537299	21-04-93
-----				
WO-A-9304701	18-03-93	AU-A-	2678092	05-04-93
-----				
WO-A-8910348	02-11-89	GB-A-	2217319	25-10-89
		AU-A-	3446189	24-11-89
		EP-A-	0413709	27-02-91
		JP-T-	4506203	29-10-92
-----				
EP-A-0359347	21-03-90	US-A-	5135736	04-08-92
		JP-A-	2124833	14-05-90
		US-A-	5169933	08-12-92
-----				
WO-A-9117173	14-11-91	US-A-	5196510	23-03-93
		EP-A-	0527954	24-02-93
-----				
WO-A-9404696	03-03-94	AU-B-	5088593	15-03-94
-----				